

Correlation Between the Prevalence of Superantigenic Toxin Genes and Coagulase Serotypes of *Staphylococcus aureus* Isolates

Yeo Gyeong Kim, Han Sol Lee, Seong Kyun Kang, Kyung Soo Chang and Soo Myung Hwang*

Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan, Korea

A heterogenic group of staphylococcal exotoxins, including staphylococcal superantigenic toxins, enterotoxin (SE), toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), and coagulase are the most important virulence factors of *Staphylococcus aureus*. We analyzed the prevalence of genes encoding five enterotoxins and TSST-1 in *S. aureus* isolated from clinical ear discharges. The genes were identified by multiplex PCR and we compared the results to references of coagulase serotypes. In 102 isolates of *S. aureus*, 44 of them were methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and the others were methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA). Among both types of *S. aureus*, 33 strains were positive for *sea*, 2 for *seb*, 23 for *sec*, 26 for *see*, and 26 for *tst*. Overall, 59 (57.8%) isolates were positive for one or more superantigenic toxin genes. From these, 71.2% (42/59) strains harbored more than one toxin gene in different combinations. The major combinations of genes were *sea* and *see*, and *sec* and *tst*. The degree of possession of superantigenic toxic genes was similar in both MRSA and MSSA isolates (56.8% vs 58.6%, respectively), yet significant differences in toxin gene profiles and coagulase serotypes between two isolates were detected. All of 13 positive strains for *sec* and *tst* were MRSA and belonged to coagulase serotype II. On the other hand, 80.0% of 20 positive strains for *sea* and *see* were MSSA with coagulase serotype IV and VII, whereas 20.0% of them were MRSA with coagulase serotype IV. This data indicates that the profile of superantigenic toxin genes correlates to coagulase serotype and methicillin resistance in *S. aureus* isolates.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, Staphylococcal enterotoxins, Toxic shock syndrome toxin-1, Coagulase serotype

서론

Staphylococcus aureus (*S. aureus*)는 광범위한 화농성 질환의 주 원인균이며, 건강한 사람의 피부나 비강에서도 빈번히 집락을 형성하는 균으로 잘 알려져 있다. 1960년대 초 methicillin 내성 *S. aureus*의 출현 이래로 다약제 내성균주 증가는 병원내 감염뿐 아니라 지역사회 관련

감염으로 이어져 사회적 문제가 되고 있다 (1, 2).

*S. aureus*는 병독성인자로서 여러 가지 종류의 효소와 독소 성분을 생성 분비함으로써 숙주세포의 침투와 면역 작용을 방해하는 것으로 알려져 있다. 효소 성분으로는 coagulase, thermonuclease, lipase, hyaluronidase 등이 있으며, 독소로는 식중독의 원인인 장독소(staphylococcal enterotoxin, SE), toxic shock syndrome을 일으키는 toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1), 백혈구 파괴 독소인 leukocidin, 피부박피독소인 exfoliative toxin 등이 있다 (3~5). 이 중에서 장독소(SE)와 TSST-1 성분은 구조적 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) class II와 T 림프구 수용체의 V β 사슬에 결합하여 비특이적 T 세포증식에 의한 사이토카인의 과다 분비를 유도하는 수퍼항원성 독소(pyrogenic toxin superantigens, PTSAgs)로 잘 알려져 있다 (6, 7). 장독소(SE) 단백질 성분은 내열성이며, trypsin 등

Received: June 15, 2011/ Revised: July 25, 2011

Accepted: August 8, 2011

*Corresponding author: Soo Myung Hwang, Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea.

Phone: +82-51-510-0563, Fax: +82-51-510-0568

e-mail: smhwang@cup.ac.kr

**This work was supported by research fund from Catholic University of Pusan in 2009.

단백질 분해 효소에 저항성을 나타내는 식중독의 주 원인물질로서, 위장관성 독소로 작용할 뿐 아니라 알러지 및 자가 면역성 질환에 관여하며, 항원성 차이에 의하여 5종류의 주요 혈청형(SEA, SEB, SEC, SED, SEE)을 포함하여 SEF, SEG, SEH, SEI 및 SEJ 등의 19종류가 밝혀져 있다 (7~9). TSST-1은 발열, 발적 및 혈압 저하 등의 toxic shock syndrome을 일으키는 원인 독소로서 치명적인 질환을 유발한다 (6~9). *S. aureus* 균주에 있어서 SE와 TSST-1 독소 유전자의 전달양상은 plasmid, prophage 또는 staphylococcal pathogenicity islands (SaPI) 등의 이동성 유전인자에 의해 이루어지며 이들 병독성 인자의 유전자 발현은 accessory gene regulator (*agr*)에 의하여 조절된다. 또한 *agr* 유전자는 염기서열 차이에 의하여 4종류의 그룹으로 나누어지며, *agr* type과 SE 또는 TSST-1 유전자형이 *S. aureus* 균주의 클론성 유전자형과 연관성이 있는 것으로 알려져 있다 (10, 11).

*S. aureus*의 분리 동정에 결정적 요소이며, 사람이나 동물의 prothrombin을 활성화하여 혈전을 생성하는 coagulase는 항원성의 차이에 의하여 10종의 혈청형이 알려져 있다. *S. aureus*의 coagulase 혈청형과 유전자형 분석은 항생제 내성균주, 분리되는 검체의 종류에 따라 그 특성이 다르게 나타나고 있어 분자 역학적 연구에 이용되고 있다 (12~14).

병원 내 감염으로 인한 다약제 내성 MRSA 분리율 증가는 사회적으로 문제가 되고 있으며 또한 최근에 지역사회 관련된 MRSA의 증가 추세는 균주간의 내성인자 획득, 전파 그리고 병독성인자의 변형 등의 변이균종으로 이어져 새로운 superbacteria 출현이라는 어려움에 직면하고 있다. 이들 내성균과 변이균주의 출현을 확인하고, 예방하기 위해서는 다양한 분자 역학적 분석법을 이용하여 지속적인 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다. Coagulase 형별 분석, 독소 생성능, 항생제 감수성 결과의 비교 분석은 *S. aureus* 균주의 유전적 변이에 따른 특성변화를 예측할 수 있는 가장 기초적인 방법으로 쉽게 이행할 수 있는 역학적 분석법이라 생각된다.

본 연구에서는 임상검체 귀 분비물에서 분리된 *S. aureus* 균주에서 수피항원성 독소인 5종류의 SE와 TSST-1 독소 생성 유전자의 보유양상을 분석하고 생물학적 특성인 coagulase 혈청형과 methicillin 내성과의 상관성을 비교하였다.

재료 및 방법

실험균주

2005년과 2006년 부산시 소재 2개 종합병원에 내원한 102명 환자의 귀 분비물에서 개별적으로 분리 동정된 *S. aureus* 102주를 실험균주로 사용하였다. 총 102주의 항생제 감수성 시험결과에서 oxacillin 내성(>4 mg/L) 균주로 확인된 MRSA 균주는 44주이었으며, 나머지 58주는 methicillin 감수성(MSSA) 균주이었다. SE 독소 생성 표준균주는 ATCC13565 (*sea*), ATCC14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC23235 (*sed*), ATCC 27664 (*see*)를, TSST-1 생성균주는 SM103 균주를 사용하였다.

DNA 분리 및 methicillin 내성 유전자(*mecA*) 확인

균주의 genomic DNA 분리는 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER Co. Ltd. Seoul, Korea)를 이용하여 추출하였다. Methicillin 내성 유전자인 *mecA* 검출은 Mehrotra (4) 등의 방법을 응용하여 PCR 법으로 실시하였다.

Multiplex PCR법에 의한 SE와 TSST-1 독소 유전자 분석

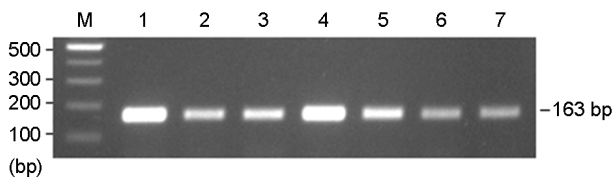
SE와 TSST-1 유전자 분석은 Mehrotra (4)와 Johnson (5) 등의 방법을 응용하여 3조합(set A: *sea*와 *see*, set B: *seb*와 *sed*, set C: *sec*와 *tst*)으로 나누어 실시하였으며, 사용된 primer는 Table 1과 같다. PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR Premix Kit를 사용하여, DNA 시료(75 ng) 1 µl, 각 조합별 primer (10 pmol)를 각각 0.5 µl 넣고 증류수로 총 20 µl로 최종 부피를 맞추었다. PCR 조건은 94°C에서 4분간 초기 반응, 94°C 30초, 53°C 30초, 72°C 1분의 과정으로 35회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 4분 연장으로 PCR을 종결하였다. 증폭된 DNA 시료는 1.5% agarose gel을 통하여 전기영동을 실시하였고, 각 증폭산물의 크기를 확인하여 독소 유전자 유무를 결정하였다.

Coagulase 혈청형 시험

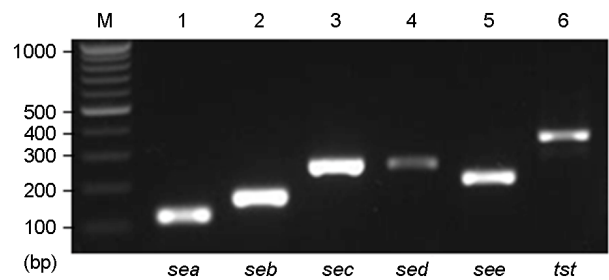
*S. aureus*의 coagulase 혈청형 분석은 8종(Type I-VIII)의 항혈청(Denka Seiken Co, Tokyo Japan)을 사용하여 Hwang 등 (15)의 방법으로 분석하였다. Nutrient agar 배지에 자란 한 집락을 5 ml brain heart infusion broth (BHI)에 접종

Table 1. Primers for PCR amplification of toxin gene typing

Genes	Primer names	Primer sequences (5'-3')	Amplified size (bp)	Reference
<i>sea</i>	SEA12-1	TTGGAACGTTAAAAACGAA	120	5
	SEA12-2	GAACCTTCCCATCAAAAACA		
<i>seb</i>	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAAGTACGAGC	164	4
	GSEBR-2	CCAAATAGTGACGAGTTAGG		
<i>sec</i>	SEC-1	GACATAAAAGCTAGGAATTT	257	5
	SEC-2	AAATCGGATTAAATCCATTC		
<i>sed</i>	GSEDR-1	CCAATAATAGGAGAAATAAAAG	278	4
	GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTTCGTTTC		
<i>see</i>	GSEER-1	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	209	4
	GSEER-2	CTTTTTTTCCTTCGGTCAATC		
<i>tst</i>	TSST-1	ATGGCAGCATCAGCTTGATA	350	5
	TSST-2	TTTCCAATAACCCCGTTT		
<i>mecA</i>	MEC163-1	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	163	4
	MEC163-2	CTGGTGAAGTTGTAATCTGG		

**Figure 1.** Agarose gel analysis of PCR-amplified *mecA* genes from MRSA isolates. Lanes: M, 100 bp ladder; 1 to 7, MRSA isolates.

하여 37℃ shaking incubator에서 하룻밤 배양한 후, 0.1 ml의 균배양액을 새로운 5 ml BHI broth에 접종하여 4~5시간 배양을 하여 균의 농도가 10^8 CFU/ml 되게 조정하고, $6,000 \times g$, 20분 동안 원심 분리하여 그 상층액을 분석시료로 사용하였다. Coagulase 기질용액으로는 polyethylene-aminocarpronic acid-fibrinogen (PAF)를 사용하였다. U-microplate 각 well에 항혈청 8종을 각각 10 μ l 집어넣고, 시료 10 μ l를 각 항혈청이 들어 있는 well에 가하여 가볍게 혼합한 다음 실온에서 5분 방치하였다. 그 다음으로 PAF 기질용액을 각 well에 20 μ l 넣은 후 37℃ incubator에서 2시간 이후 부터 30분 간격으로 형특이 coagulase와 항혈청간의 중화 반응에 의한 응고억제반응 여부를 관찰하였다.

**Figure 2.** Agarose gel analysis of PCR-amplified toxin genes from the standard strains of *S. aureus*. Lanes: M, 100 bp ladder; 1, *sea* (120 bp); 2, *seb* (164 bp); 3, *sec* (257 bp); 4, *sed* (278 bp); 5, *see* (209 bp); 6, *tst* (350 bp).

결 과

Methicillin 내성균주로부터 *mecA* 유전자 확인

항생제 감수성 시험에서 oxacillin 내성(>4 mg/L)인 44 균주를 대상으로 *mecA* 유전자를 분석한 결과, 163 bp 크기의 *mecA* 유전자가 모두 검출되어 methicillin 내성균임을 확인하였다(Fig. 1).

SE와 TSST-1 독소 유전자 확인

표준균주에서의 SE와 TSST-1 유전자 확인과 multiplex PCR법으로 분석한 결과는 Fig. 2와 Fig. 3과 같다.

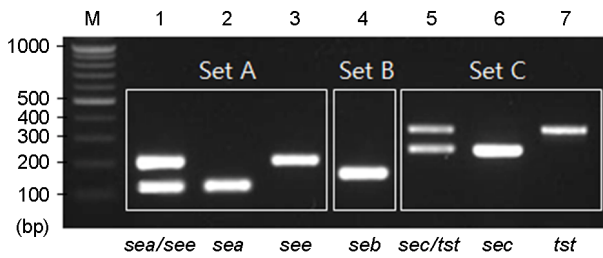


Figure 3. Multiplex PCR patterns of toxin genes from *S. aureus* isolates. Lanes: M, 100 bp ladder; 1 to 3, primer set A; 4, primer set B; 5 to 7, primer set C.

Table 2. Prevalence of SE and TSST-1 genes in *S. aureus* isolates

Toxin gene	No. (%) of isolates			<i>p</i> value
	MRSA (n=44)	MSSA (n=58)	Total (n=102)	
<i>sea</i>	7 (15.9)	26 (44.8)	33 (32.4)	0.008
<i>seb</i>	–	2 (3.4)	2 (2.0)	0.244
<i>sec</i>	14 (31.8)	9 (15.5)	23 (22.5)	0.022
<i>sed</i>	–	–	–	–
<i>see</i>	4 (9.1)	22 (38.0)	26 (25.5)	0.003
<i>tst</i>	19 (43.2)	7 (12.1)	26 (25.5)	0.000

MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*.
P value based on Pearson chi-square test. *p* < 0.05, statistical significance.

총 102 *S. aureus* 균주에서 5종류의 SE와 TSST-1 각각의 유전자 분리율을 살펴보면 *sea* 보유균주는 33주, *seb* 2주, *sec* 23주, *see* 26주, *tst* 26주로, 가장 분리율이 높은 독소 유전자는 *sea* (32.4%)이었으며, 그 다음으로 *see* (25.5%)와 *tst* (25.5%), *sec* (22.5%) 순이었으며 *sed* 유전자는 검출되지 않았다(Table 2). *se* 또는 *tst* 유전자 중에서 하나 또는 둘 이상의 유전자 보유균주는 총 102균주 중 59주 (57.8%)이었고, MRSA와 MSSA 균주에서의 유전자 보유율은 각각 56.8%와 58.6%로 나타내어 MRSA 균주와 MSSA 균주간의 독소 유전자 분리율은 유사하였다. 그러나 보유 유전자의 종류 및 조합은 크게 다른 것으로 확인되었다. *sea* 또는 *sea*와 *see* 유전자는 주로 MSSA 균주에서 분리되었고, 반면에 *sec*와 *tst* 유전자는 MRSA 균주에서 분리되어, *S. aureus* 균주의 methicillin 내성과 상관성이 있음을 확인하였다(Table 3).

Table 3. Combination of SE and TSST-1 genes in *S. aureus* isolates

Toxin gene	No. (%) of isolates		
	MRSA (n=44)	MSSA (n=58)	Total (n=102)
<i>sea</i>	2	2	4
<i>sea, seb</i>	–	1	1
<i>sea, seb, tst</i>	–	1	1
<i>sea, sec, tst</i>	1	–	1
<i>sea, sec, see</i>	–	3	3
<i>sea, sec, see, tst</i>	–	1	1
<i>sea, see</i>	4	16	20
<i>sea, see, tst</i>	–	2	2
<i>sec</i>	–	5	5
<i>sec, tst</i>	13	–	13
<i>tst</i>	5	3	8
Total	25 (56.8)	34 (58.6)	59 (57.8)

Coagulase 혈청형

총 102주 *S. aureus*의 coagulase 혈청형을 분석한 결과, I형에서 VIII형까지 8종의 coagulase형이 분리되었다. MRSA와 MSSA 균주의 coagulase 형별 차이를 비교한 결과는 Table 4와 같다. MRSA 44주에서 coagulase II형이 19주로 가장 분리율이 높았으며 다음으로 IV형: 15주, V형: 7주 순이었다. MSSA 58주에서는 VII형이 16주, IV형: 15, V형: 14주이었으며, MRSA에서는 분리되지 않았던 III형, VI, VIII형이 분리되었다.

SE, TSST-1 독소 유전자와 coagulase 혈청형과의 상관성

수퍼항원성 독소 유전자인 주요 5종의 SE 및 TSST-1 유전자형과 coagulase 혈청형과의 상관성을 비교한 결과는 Table 5와 같다. MRSA 균주에서만 분리된 19주의 coagulase II형에서 *sea*, *sec*, *tst* 세 종류를 보유한 1균주를 포함하여 *sec*와 *tst* 두 개의 유전자를 보유한 균주가 14주, *tst*만 보유한 균주는 5주로, 모두 *sec* 또는 *tst* 유전자가 검출되었다. 30주의 coagulase IV형 균주에서는 20주가 독소 유전자를 보유하고 있었으며, *sec*만 갖고 있는 1균주를 제외한 19균주는 모두 *sea* 또는 *sea*와 *see* 두 유전자를 갖고 있음을 확인하였다. 또한 coagulase IV형 균

Table 4. Distribution of coagulase serotypes of *S. aureus* isolates

Strains	No. (%) of isolates	Coagulase serotype								
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	ND
MRSA	44	1	19	0	15	7	0	1	0	1
MSSA	58	0	0	4	15	14	2	16	3	4
Total	102 (100)	1 (1.0)	19 (18.6)	4 (3.9)	30 (29.4)	21 (20.6)	2 (2.0)	17 (16.7)	3 (2.9)	5 (4.9)

ND, not determined.

Table 5. Correlation between prevalence of superantigenic toxin genes and coagulase serotypes in *S. aureus* isolates

Toxin gene	No. of isolates	Coagulase serotype								
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	ND
<i>sea</i>	4	—	—	—	3 (2)*	—	—	1	—	—
<i>sea, seb</i>	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—
<i>sea, seb, tst</i>	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—
<i>sea, sec, tst</i>	1	—	(1)*	—	—	—	—	—	—	—
<i>sea, sec, see</i>	3	—	—	—	—	—	—	3	—	—
<i>sea, sec, see, tst</i>	1	—	—	—	1	—	—	—	—	—
<i>sea, see</i>	20	—	—	—	14 (4)*	—	—	6	—	—
<i>sea, see, tst</i>	2	—	—	—	1	—	—	1	—	—
<i>sec</i>	5	—	—	—	1	1	—	1	1	1
<i>sec, tst</i>	13	—	(13)*	—	—	—	—	—	—	—
<i>tst</i>	8	—	(5)*	—	—	3	—	—	—	—

(*), No. of MRSA strains.

주 중 6주의 MRSA는 나머지 MSSA 균주와 같이 *sea* 또는 *sea*와 *see* 유전자를 갖고 있어서, coagulase IV형과 독소 유전자형간의 상관성이 있음을 확인하였다. Coagulase VII형인 경우는 모두 MSSA 균주에서 분리되었으며, 이들 균주에서도 *sea*와 *see* 보유균주가 6주, *sea, sec*와 *see* 보유균주가 3주로, *sea*와 *see* 유전자가 많이 분리되었다. Coagulase V형에서는 5주의 MSSA 균주에서 *sea*와 *seb* (1주), *sec* (1주), *tst* (3주)가 분리되었다. 반면에 coagulase I, III, VI형의 균주에서는 독소 유전자가 분리되지 않았다.

고 찰

*S. aureus*는 가장 흔히 발견되는 병원성 세균으로 다양한 치명적 질환을 유발한다.

이들 균종의 다약제 내성균 출현은 병원 감염 및 지역

사회 감염에 의한 사회적 문제가 되고 있다 (16, 17). 본 실험에서는 임상검체 중 귀 분비물에서 분리한 MRSA와 MSSA 균주에서 슈퍼항원성 독소 유전자인 5종의 SE 유전자와 TSST-1 유전자를 multiplex PCR법으로 확인하였다. 총 실험균주의 57.8%에서 한 종류 또는 두 종류 이상의 독소 유전자가 확인되었으며, MRSA와 MSSA 균주간의 유전자 분리율은 각각 56.8% (25/44주)와 58.6% (34/58주)로 유사하였으나, 이들 균주간의 보유 유전자 종류에서 큰 차이를 나타내었다. MRSA 균주에서 분리된 주요 유전자는 *sec*와 *tst*이었으며, 두 유전자 모두 보유한 균주는 29.5% (13/44주)이었다. MSSA 균주에서는 *sec*와 *tst* 유전자 보유균주는 현저히 낮았으며, 반면에 *sea*와 *see* 유전자를 갖는 균주가 우세하였고, 두 유전자를 동시에 갖는 균주는 27.6% (16/58주)를 나타냄으로써, methicillin 내성에 따른 균주간의 차이를 확인할 수 있었다. *S. aureus*

의 독소 유전자와 항생제 내성 유전자 획득은 plasmid, prophage, transposon 등의 유전인자에 의하여 이루어지나, 최근 연구결과에 의하면 chromosomal islands 삽입의 이동성 유전자 복합체인 staphylococcal pathogenicity islands (SaPIs)와 staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) 유전자가 수퍼항원성 독소 유전자와 methicillin 내성 *mecA* 유전자 전달에 각각 작용하는 것으로 보고되었다 (6, 9). 또한 이들 유전자 복합체의 특성에 따라 *S. aureus*의 유전자형을 분류할 수 있다. MRSA 균주가 MSSA 균주보다 이동성 유전인자인 SaPIs를 포함하여 prophages, plasmid를 더 많이 보유하고 있다는 연구결과에서 SE와 TSST-1 독소 유전자형과 상관성이 있는 것으로 보고하고 있으나, 특정 독소 유전자 보유와 이동성 유전인자와의 관련성은 아직 규명되지 않았다 (9). Hu 등(9)의 연구결과에 의하면 다양한 임상검체에서 분리된 MRSA 균주에서 분리된 주요 유전자는 *sec*와 *tst*이었으며, MSSA 균주에서는 *sea*가 우세한 유전자로서, 본 실험결과와 유사하였으나 *see* 분리율에서 차이를 나타내었다. Peck 등 (3)은 혈액과 비강검체에서 분리된 *S. aureus*의 독소 유전자 비교 분석에서 MRSA 균주에서만 *sec* 유전자를 확인하였고, *tst* 유전자는 MRSA와 MSSA 균주에서 각각 72.2%, 53.3%의 분리율을 나타내었으며, Kim 등 (1)은 혈액에서 분리된 균주에서 *sea*와 *see* 유전자가 MSSA 보다 MRSA 균주에서 더 많이 분리되었음을 보고함으로써 본 실험의 결과와 차이가 있음을 확인하였다. 또한 Collery 등 (18)은 유럽 지역 건강한 대학생 48명의 비강에서 분리된 *S. aureus* 균주에서 *seb* 유전자가 5종의 SE 유전자 중 75%로 가장 많이 분리됨을 보고하였으며, Sila 등 (19)의 연구에서는 MSSA 균주에서 *sec*와 *tst* 양성균주가 더 많은 것으로 보고함으로써 연구결과에 따른 차이를 나타내었다.

S. aureus 균주가 생성하는 coagulase는 *coa* 유전자의 특성에 따라 10종의 항원성이 다른 혈청형이 존재한다 (12). 본 실험에 사용된 귀 분비물 검체에서 분리된 MRSA 균주의 coagulase는 혈청형 II형이 가장 많았고, 다음으로 IV형, V형 순이었으며, MSSA 균주에서는 VII, IV 및 V형과, III, VI와 VIII형이 분리되었다. 이와 같은 결과는 귀 분비물에서 분리된 MRSA와 MSSA의 coagulase 혈청형은 다른 임상검체에서 분리된 MRSA의 혈청형과 그 분포도가 유사하였으나 (20), 상대적으로 coagulase IV형의 분리율이 더 높은 것으로 확인되어 검체에 따른 차이를 나타내었다. *S. aureus* 균주에서 coagulase 유전자의 전환에

의한 혈청형 변화와 내성 유전자 SCC*mec* 획득 기전은 아직 정확히 밝혀져 있지 않지만, 숙주세포의 방어체계에 대처하기 위한 미생물의 유전적 변이로 설명하고 있다 (12). SE와 TSST-1 유전자형과 coagulase 혈청형과 비교한 결과에서, coagulase II형 MRSA 균주 모두는 *sec*, *tst* 또는 *sec*와 *tst* 유전자가 분리되었고($p < 0.05$), coagulase IV형 30주 중 19주에서 분리된 유전자는 *sea* 또는 *sea*와 *see*로서($p < 0.05$), MRSA 균주에서 40% (6/15주), MSSA 균주에서는 93.3% (13/15주)의 분리율을 나타내었다. Coagulase VII형과 V형인 경우 MSSA 균주에서만 *sea*와 *see* 유전자를 포함하여 *sea*와 *seb*, *sec*, *tst* 유전자가 확인되었고 MRSA 균주에서는 검출되지 않았다. Hwang 등 (20)은 coagulase 항원성의 변화와 *mecA* 유전자 획득과 상관성이 있음을 보고한 바 있다. 특히 coagulase V형은 MSSA 균주에서만 분리되었으나 2005년 이후 coagulase V형 MRSA 균주의 증가와 이들 균주의 methicillin 내성 유전자 복합체 SCC*mec*형은 IV형임을 보고하였다 (21). Coagulase V형 MSSA 균주에서만 독소 유전자가 분리되었고, MRSA 균주에서 분리되지 않은 결과에서, methicillin 내성 유전자 획득과 독소 유전자의 조절기능에 상호 관련이 있음을 추정할 수 있겠다. 국내에서 분리된 MRSA 균주 중에는 *sec*와 *tst* 유전자를 동시에 갖고 있는 균주가 가장 많으며(43.6%), 이들 대부분은 SCC*mec* II형에 속하는 것으로 알려져 있다 (22). 일본에서 병원 내 감염의 주요 MRSA의 유전자형은 뉴욕/일본 클론으로 SCC*mec* II형, sequence type 5 (ST5), *agr* type 2, coagulase II형, *sec*와 *tst* 유전자 양성의 특성을 갖고 있다 (11). 이들 균주는 우리나라에서 분리되는 MRSA 균주와 관련이 있는 것으로 생각되어지나 독소 유전자를 비롯하여 coagulase 형별 분석, 항생제 내성 유전자의 분석과 그 상관성에 관한 연구 결과는 거의 없는 실정이다. 본 실험에서 일부분의 수퍼항원성 독소 유전자형을 분석하였지만 coagulase형에 따라, 또한 methicillin 내성과 상관성이 있음을 예측할 수 있었다. *S. aureus*의 분자 역학 연구방법으로 pulse-field gel electrophoresis (PFGE)를 비롯하여, multilocus sequence typing (MLST), protein A 유전자, toxin 조절 유전자 등 PCR 분석법을 이용하여 유전자형을 결정하고 있다 (23~25). 이 중에서 생물학적 특성을 이용한 coagulase형, 항생제 내성을 및 수퍼항원성 독소 생성능 등의 연구는 균종의 특성 변화와 변이 균주 출현을 예측할 수 있는 기본적인 방법이다. 특히 *S. aureus*의 coagulase 혈청형 분

석은 간편하고 재현성이 좋은 검사방법으로서, 분자 역학적인 방법인 random amplified polymorphism DNA analysis (RAPD) 분석결과와 비교하였을 때 coagulase형에 따라 유의성 있는 결과를 얻을 수 있었다(data not shown).

본 실험에서 부산지역에서 분리된 methicillin 내성 *S. aureus* (MRSA)와 methicillin 감수성 *S. aureus* (MSSA) 군주에서 5종의 주요 SE와 TSST-1 유전자형을 분석한 결과 methicillin 내성과 coagulase 혈청형에 따른 독소 유전자형의 특성을 확인하였다. 특히 지역사회 관련 MRSA균주의 분리율이 높은 검체로 알려진 귀 분비물에서 (26) 분리된 *S. aureus* 군주에서의 비교 분석 결과는 이들 군종의 병원성과 분자 역학적 연구의 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Kim YK, Kim JS, Kim HS, Song W, Cho HC, Lee KM. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from blood on the basis of coagulase gene polymorphism and toxin genes. Korean J Lab Med 2008;28:286-92.
- Eady EA, Cove JH. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*-an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. Curr Opin Infect Dis 2003;16:103-24.
- Peck KR, Baek JY, Song JH, Ko KS. Comparison of genotypes and enterotoxin genes between *Staphylococcus aureus* isolates from blood and nasal colonizers in a Korean hospital. J Korean Med Sci. 2009;24:585-91.
- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol 2000;38:1032-5.
- Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991;29:426-30.
- Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. Toxins 2010;2:2117-31.
- Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. J Clin Microbiol 2003;41:1434-9.
- Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis 2006;193:1495-503.
- Hu DL, Omoe K, Inoue F, Kasai T, Yasujima M, Shinagawa K, et al. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. J Med Microbiol 2008;57:1106-12.
- Novick RP. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. Plasmid 2003;49:93-105.
- Zaraket H, Otsuka T, Saito K, Dohmae S, Takano T, Higuchi W, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Niigata, Japan: divergence and transmission. Microbiol Immunol 2007;51:171-6.
- Watanabe S, Ito I, Takeuchi E, Endo M, Okuno E, Hiramatsu K. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2005;187:3698-707.
- Kanemitsu K, Yamamoto H, Takemura H, Kaku M, Shimada J. Relatedness between the coagulase gene 3'-end region and coagulase serotypes among *Staphylococcus aureus* strains. Microbiol Immunol 2001;45:23-7.
- Ishino K, Tsuchizaki N, Ishikawa J, Hotta K. Usefulness of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism typing of the coagulase gene to discriminate arbekacin-resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol 2007;45:607-9.
- Hwang SM, Seki K, Sakurada J, Ogasawara M, Murai M, Ohmayu S, et al. Improved methods for detection and serotyping of coagulase from *Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol 1989;33:175-82.
- Hisata K, Kuwahara-Arai K, Yamamoto M, Ito T, Nakatomi Y, Cui L, et al. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. J Clin Microbiol 2005;43:3364-72.
- Hanssen AM, Fossum A, Mikalsen J, Halvorsen DS, Bukholm G, Sollid JU. Dissemination of Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Northern Norway: sequence types 8 and 80 predominate. J Clin Microbiol 2005;

- 43:2118-24.
- 18) Coltery MM, Smyth DS, Twohig JM, Shore AC, Coleman DC, Smyth CJ. Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, *agr* locus types and multiple locus, variable number tandem repeat analysis. J Med Microbiol 2008;57:348-58.
- 19) Sila J, Sauer P, Kolar M. Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, panton-valentine leukocidin and *tsst-1* between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* at the university hospital in Olomouc. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2009;153:215-8.
- 20) Hwang SM, Kim TU. Changes in coagulase serotype of *Staphylococcus aureus* isolates in Busan, 1994-2005. Kor J Microbiol 2007;43:346-50.
- 21) Cha EK, Chang KS, Hwang SM. Correlation between staphylococcal cassette chromosome *mec* type and coagulase serotype of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2009;39:71-8.
- 22) Kim JS, Song W, Kim HS, Cho HC, Lee KM, Choi MS, et al. Association between the methicillin resistance of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, their staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) subtype classification, and their toxin gene profiles. Diagn Microbiol Infect Dis 2006;56:289-95.
- 23) Durand G, Bes M, Meugnier H, Enright MC, Forey F, Liassine N, et al. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital-and community-acquired infections in France. J Clin Microbiol 2006;44:847-53.
- 24) Kim JS, Kim HS, Song W, Cho HC, Lee KM, Kim EC. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with toxic shock syndrome toxin and staphylococcal enterotoxin C genes. Korean J Lab Med 2007;27:118-23.
- 25) Chini V, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Occurrence of the enterotoxin gene cluster and the toxic shock syndrome toxin 1 gene among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is related to clonal type and *agr* group. J Clin Microbiol 2006;44:1881-3.
- 26) Song JS, Choe PG, Song KH, Cho JH, Kim SH, Bang JH, et al. Multicenter study for frequency and clinical features of community-Associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. Infect Chemother 2006;38:325-33.