

식품에서 분리한 황색포도상구균속의 독소성 쇼크 증후 군(Toxic Shock Syndrome Toxin)유전자 검출

미생물검사팀

육동현 · 김은정 · 이영기 · 유승희 · 김미선 · 최성민 · 오수경

TSST(Toxic Shock Syndrom Toxin)Gene Identification of Staphylococcus species Isolated from food

Microbial Inspection Team

**Dong-hyun Yuk, En-jeung Kim, Young-kee Lee, Seung-hee Ryu, Mi-sun Kim,
Sung-min Choi and Soo-kyoung Oh**

Abstract

We isolated *Staphylococcus spp.* 32 strains from food sample in Seoul area by coagulase test, antibiotic sensitivity test, PCR identification of toxic shock syndrome toxin gene from 1999 to 2000.

1. We examined food samples(kim pab 1,186, cream bread 397, bojonsik 387, frozen food 459, pork & beef 330)in Seoul area from January 1999 to December 2000.
2. Of toxic shock syndrome toxin gene tested, 3 strains(6%) isolated from cream bread, salad, rice cake.
3. Of 32 *Staphylococcus spp.* resistance rate to penicillin, polymyxin B was 100%, and followed by ampicillin 81.2% and erythromycin 15.7%, kanamycin 9.3%, gentamycin 3.15%, chlhamphenicol 0%, respectively.
4. Among multiple drug resistance, resistance to 5 drugs was 3.12%, 3 drugs 56.25%, 2 drugs 15.62%, respectively. The multiple-resistance patterns detected highly were AM-GM-K-P-PB(1 strain), AM-E-P-PB,AM-E-P-PB, AM-K-P-PB, AM-GM-P-PB(8 strains), AM-P-PB, E-P-PB(18 strains), P-PB(5 strains).
5. Of 32 isolated from foods, detection of toxic shock syndrome toxic gene was 3 strains.

서 론

황색포도상구균은 자연계에 가장 널리 분포되어 있는 균종의 하나로 사람을 비롯한 각종 동물의 피부와 상기도, 장관막등의 정상세균총으로 존재한다¹⁾.

포도구균 식중독은 원인식품중에 혼입된 균이 증식과정을 통하여 산생된 독소를 섭취하여 발생하는 독소형 식중독의 대표적인 유형이다. Dack등²⁾은 균체외독소에 의한 독소성질환으로 독소의 존재를 증명하였고, 그후 Sugiyama와 Hayama³⁾의 임상실험을 통해 독성물질은

확인한후 황색포도상구균이 생산하는 장독소를 황색포도상구균성 장독소(Staphylococcal enterotoxin, SEs)라 부르게되었다. 장관독소는 A,B,C,D,E,F의 6종류⁴⁾가 있으나 최근에는 9개의 antigenic type (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ)으로 나뉜다.⁵⁾

황색포도구균에 의해 발생하는 또하나의 독소형 증독 증은 독소성 쇼크증후군이다. Todd가⁶⁾ 발열, 발진, 혈압강하, 각종 장기에 장애를 일으키는 것이 포도구균성 쇼크증상이라 보고한후 독소성 쇼크 증후군(toxic shock syndrom, TSS)라 부르게 되었다. TSS는 enterotoxin F와 pyogenic exotoxin C와 유사⁷⁾하고, TSS를 유발하는 독소 중 황색포도구균성 독소를 독소성 쇼크 증후군 독소(toxic shock syndrom toxin, TSST)라 한다.

최근 단체급식의 증가, 외식 산업의 발달로 인하여 각종 식중독이 증가하고 종류도 다양해지고 있다. 우리나라의 경우 황색포도상구균에 의한 식중독 발생사례가 여름철뿐만 아니라 연중 발생하고 있으며 이와 같이 위험성을 가지고 있는 황색포도상구균을 유통식품 및 집단급식소 검체에서 분리하여 오염도를 조사하고 PCR을 이용한 TSST인자를 확인 동정 및 항생제 내성을 조사하여 식품의 유통, 조리, 보관시 안전성을 확보, 시민건강에 이바지 하고자 한다.

재료 및 방법

1. 식품 분리 균주

사용한 검체는 1999년 1월부터 2000년 12월 까지 서울시내에 유통중인 식품 및 민원의회 도시락류 1,186건, 빵류 397건, 기타식품(집단급식소등) 387건, 냉동식품 459건, 축산물 330건을 사용하여 포도구균을 검출하였다.

2. 황색포도구균의 분리 및 동정

황색포도상구균의 분리시험은 미국 FDA Bacteriological Analytical Manual (8th)에 의하여 실시하였다.

시료 25g을 무균적으로 취하여 10% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth(TSB, Difco)배지 225ml에 넣고 stomacher로 1분간 균질화 시켰다. 균질화된 혼합액을

37℃에 24시간 증균배양 하였다.

증균배양액을 황색포도상구균 선택배지인 난황이 첨가된 mannitol salt agar(MSA, Difco) 평판배지에 접종하여 37℃에서 24시간 배양후 선택배지에서 전형적 성상을 나타내는 집락을 선별하여 그람염색, catalase 시험, O/F 포도당분해능 시험, coagulase 생성능, DNase 생성능 등의 시험과 API Staph system(API Staph, BioMerieux SA, France)을 이용하는 bacteriological analytical manual에 따라 황색포도상구균을 확인 동정하였다.

3. 항생제 감수성 시험

분리된 황색포도상구균의 항생제 감수성 시험은 Ampicillin (AM: 10mcg), Carbenicillin(CB: 100mcg), Cephalothin(CF:30mcg), Chloramphenicol(CM:30mcg), Ciprofloxacin(CIP: 5mcg), Erythromycin(E:15mcg), Kanamycin(KM: 30mcg), Gentamycin(GM:10mcg), Neomycin(N: 30mcg), Novobiocine(NB: 30mcg), Penicillin(P:10 U), Polymyxin(PB:300 U), Vancomycin(Va: 30mcg) 등 모두 13종(BBL)의 항생물질을 사용하여 디스크 확산법에 의하여 시험하였다. 즉, 분리균주를 Müller-Hinton 배지(Difco)10ml에 접종하여 37℃에서 18-24시간 배양했다. 시험균액을 MacFarland No. 0.5 표준 비색관(1% BaCl₂ 0.5ml + 1% H₂SO₄ 99.5ml: 10⁸ CFU/ml)에 맞추고 Müller Hinton agar(Difco)를 멸균하여 45~50℃로 식힌 후 직경 90mm의 멸균 페트리디쉬에 20ml씩 배지를 붓고 굳힌 다음 표준 농도화된 균액을 배지 전체에 발랐다. 10분간 방치시켜 표면의 습기를 흡수시킨 후 디스크를 배지에 접종하여 37℃에서 18시간 동안 배양하였다. 배양 후 저지환의 크기를 측정하여 NCCLS(National Committee Clinical Laboratory Standard)기준⁸⁾에 의해 내성과 감수성을 판정하였다.

4. 시험균의 DNA 분리 및 정제

PCR에 사용할 실험균의 주형 DNA는 Karsten B. 등⁹⁾ 및 Gerhard 등¹⁰⁾의 방법으로 실시하였다. 즉, 분리 균주를 Brain heart infusion 배지 10ml에 접종하여 18-24시간 진탕배양 한 후 원심분리 (12,000rpm 3분)하여 집균하고, 집균한 균액은 다시 TE buffer(10mM Tris 1mM EDTA pH 8.0)185 μl에 재부유시켰다.

Lysostaphin(15mg/ml) 15 μ l를 가하여 잘 섞은 다음 37 $^{\circ}$ C 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 10% SDS 30 μ l, Proteinase K(20mg/ml I TE buffer) 및 RNase(10mg/ml in TE buffer) 5 μ l를 가하고 잘 섞은 다음 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 5M NaCl 100 μ l를 가하고 잘 섞은 다음, 65 $^{\circ}$ C로 가온시킨 CTAB(Hexadecyltrimethyl ammonium bromide)용액을 80 μ l 가하여 잘 섞었다. 이 때 백색의 응고물이 생기지 않도록 잘 흔들어서 섞은 다음 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 동량의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)을 가하고 잘 섞은 다음 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 점액성 상층액을 새 원심분리관에 옮긴 다음 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1)을 가하고 손으로 격렬하게 흔들었다. 15,000 rpm으로 다시 5분간 원심분리한 후 상층액을 새 튜브에 옮겼다. 이 때 흰 응고물이 혼입되지 않도록 주의하여 옮겼다. 이 용액에 0.6 용량의 isopropanol을 가하고 백색의 DNA 침전물이 보일 때까지 손으로 앞뒤로 흔들어서 섞었다. 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 isopropanol을 버린 다음 침전물에 70% ethanol을 가하였다. 실온에서 70% ethanol로 DNA 침전물을 씻은 다음 vacuum evaporator를 이용하여 ethanol을 완전히 날려보내고 멸균 증류수에 용해시켰다. 이 용액 10 μ l에 증류수 390 μ l를 가하여 1:40으로 희석한 후, 파장 260nm 및 280 nm로 측정하여 DNA의 순도와 농도를 측정하여(1 OD₂₆₀ = 50 μ g/ml), 50ng/ μ l가 되도록 보정하였다.

5. TSS 유전자를 검출을위한 종합효소연쇄 반응(PCR)

PCR에 사용된 primer는 황색포도상구균의 독소성 쇼크 증후군 독소 유전자 *tst*와 특이적으로 결합하는 독소성 쇼크증후군 독소1형유전자(TST-1, TaKaRa社) primer set를 사용하였다. PCR을 위한 반응액은 0.6ml 원심관에 10 \times PCR buffer(TaKaRa 社) 5 μ l, 2.5mM dNTP Mixture(TaKaRa 社) 4 μ l, 각 primer-1 0.5 μ l, primer-2 0.5 μ l, Taq DNA polymerase(5U/ μ l) 0.25 μ l, template DNA 5 μ l, ddH₂O 34.75 μ l를 첨가하여 총 반응액을 50 μ l로 하였다. DNA 증폭은 Thermal Cycler 9700(Perkin-Elmer Corp.)

을 이용하여 하였으며, 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension하는 것을 1cycle로 하여 35cycles을 반응시키고 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응을 연장하였다. 증폭된 DNA의 확인은 1% agarose gel에서 전기 영동 한 후 etidium bromide(5 μ g/ml)로 염색한 후 UV transilluminator로 밴드를 관찰하였다

결과 및 고찰

1. 병원성 황색포도상구균의 검출

사용한 검체는 1999년 1월부터 2000년 12월 까지 서울시내에 유통중인 식품 및 민원의뢰 도시락류 1,186건, 빵류 397건, 기타식품(집단급식소등) 387건, 냉동식품 459건, 축산물 330건을 사용하여 포도구균을 검출하였다. 이들 식품에서 황색포도상구균을 총32주를 검출하였다. 분리주중 혈장응고 양성, 용혈독양성, API 등의 생화학 실험을 바탕으로 선별한 결과 크림빵류 7주, 축산물 5주, 김밥 4주, 보존식 2주, 햄버거 2주, 기타 12주 총 32주를 선별하였다(Table 1)

2. 식품에서 분리한 *S.aureus*의 항생제 감수성

서울 시내 유통중인 식품에서 분리된 황색포도상구균의 항생제 감수성 결과는 Table 2와 같았다. 13개의 항생제중 ampicillin, penicillin, polymyxin B가 높은 내성을 나타내었다. 그러나 cephalothin, chloramphenicol, ciproflaxacin, vancomycin 은 100% 감수성을 나타냈으며, novobiocin 도 높은 감수성을 나타냈으며, gentamycin, kanamycin 등도 중등도 이상의 감수성을 나타냈다.

최¹¹⁾는 식품에서 분리한 황색포도상구균의 항생제 내성에서 ampicillin과 penicillin이 93.5%, polymyxin B에 대해서도 58.3%의 높은 내성이 나타났다고 보고했다. 본 실험에서는 penicillin과 polymyxin B의 내성이 높게 나타났다. 또한 분리된 황색포도상구균은 cephalothin, vancomycin 에 100% 감수성을 나타낸 것은 일치된 결과를 보였다.

Table 1. Coagulase and biochemical results of *S. aureus* isolated from the food

No.	Source	API	Coagulase results
Sta.f-01	cream bread	6736153	+
Sta.f-02	"	6736153	+
Sta.f-03	"	6736153	+
Sta.f-04	pork	6736153	+
Sta.f-05	pork	6736153	+
Sta.f-06	fried fish	6736153	+
Sta.f-07	cabage	6736153	+
Sta.f-08	rice-cake	6736153	+
Sta.f-09	chitan	6736153	+
Sta.f-10	kim pab	6736153	+
Sta.f-11	chitan	6736153	+
Sta.f-12	bojonsik	6736153	+
Sta.f-13	fried fish	6736153	+
Sta.f-14	frozen food	6716153	+
Sta.f-15	hanburger	6736153	+
Sta.f-16	"	6736153	+
Sta.f-17	kim pab	6736153	+
Sta.f-18	fish	6736153	+
Sta.f-19	cream bread	6736153	+
Sta.f-20	"	6736153	+
Sta.f-21	kim pab	6736153	+
Sta.f-22	"	6736153	+
Sta.f-23	beef	6703051	+
Sta.f-24	pork	6716153	+
Sta.f-25	cream bread	6736113	+
Sta.f-26	bojonsik	6736153	+
Sta.f-27	cream bread	6732153	+
Sta.f-28	pork	6732153	+
Sta.f-29	chitan	6736153	+
Sta.f-30	salad	6736161	+
Sta.f-31	frozen foods	6736153	+
Sta.f-32	"	6732153	+

3. 식품에서 분리한 *S.aureus*의 항생제 다제내성

식품분리 32주에 대한 다제내성 유형을 조사한 결과

Table 2. Antimicrobial susceptibility of *S.aureus* isolated from the food

Name of antibiotics	No. of Isolates(%)		
	Resistant	Intermediate	Susceptible
Ampicillin	26(81.2)	0	6(18.8)
Carbenicillin	0	1(3.2)	31(96.8)
Cephalothin	0	0	32(100)
Chloramphenicol	0	0	32(100)
Ciproflaxacin	0	0	32(100)
Erythromycin	5(15.7)	20(62.5)	7(21.8)
Gentamicin	1(3.15)	1(3.15)	30(93.7)
Kanamycin	3(9.3)	1(3.2)	28(87.5)
Neomycin	0	21(65.6)	11(34.4)
Novobiocin	0	1(3.2)	31(96.8)
Penicillin	32(100)	0	0
Polymixin B	32(100)	0	0
Vancomycin	0	0	32(100)

는 Table 3과 같았다. 13가지 항생물질에 대하여 모두 내성을 나타낸 균주는 조사되지 않았으나, 대부분의 황색포도상구균의 분리주가 3가지 이상(84.37%)의 항생제에 대해 내성을 갖는 것으로 조사되었다. 특히 식품분리주에서 가장 많이 나타난 항생제 내성 유형은 AM-GM-K-P-PB 이었고 크림빵(Sta.f-01) 분리주 이었다.

최¹¹⁾는 식품에서 분리한 황색포도상구균의 항생제 다제내성에서 83.3%가 2가지 이상의 항생제에 내성이 나타났다고 보고했다.

Table 3. Multiplicity of resistance to antimicrobial agents of *S.aureus* isolated from the food samples

Multiplicity of resistance	Pattern	No. of isolates(%)	Total(%)
5	AM-GM-K-P-PB	1(3.12)	1(3.12)
4	AM-E-P-PB	5(15.62)	8(25.00)
	AM-K-P-PB	2(6.25)	
	AM-GM-P-PB	1(3.12)	
3	AM-P-PB	17(53.12)	18(56.25)
	E-P-PB	1(3.12)	
2	P-PB	5(15.62)	5(15.62)
Total		32(100)	32(100)

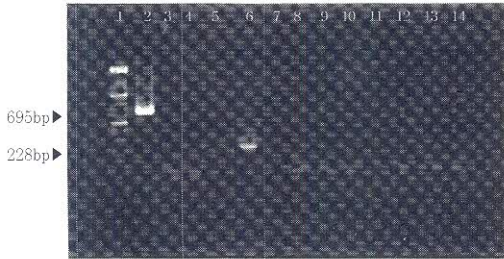


Fig. 1. Detection of TSS gene in *S.aureus* isolated from the food samples(Sta.f).

Lane 1 : Molecular size standard
 Lane 2 : Positive control DNA ST
 Lane 3~5, 7~14 : PCR product of non tss gene.
 Lane 6 : PCR product of tss gene, isolated from Sta.f-20



Fig. 2. Detection of TSS gene in *S.aureus* isolated from the food samples(Sta.f).

Lane 17 : Molecular size standard
 Lane 16 : Positive control DNA ST
 Lane 1~3, 5~10, 12~15 : PCR product of non tss gene.
 Lane 4, 11 : PCR product of tss gene, isolated from Sta.f-08, -30

4. PCR을 이용한 TSS(Toxin Shock Syndrom) 유전자의 검출

식품에서 분리되어 황색포도상구균으로 확인 동정된 분리주(32주)로부터 TSS 유전자들이 확인되었다(Fig. 1,2). 식품분리주의 TSS 유전자가 확인된 균주는 32개 실험균주중 No. Sta.f-20(크림빵), -08(떡볶이용떡), -30(감자샐러드)의 3주(9.3%)에서만 검출되었다.

결론

1999~2000년 동안 서울시에 유통식품에서 32주의 황색포도상구균을 분리하여 이들 균의 혈장응고시험, 항생제 감수성 시험, PCR을 이용한 독소성 쇼크 증후군 유전자 검출시험을 실시한 결과는 다음과 같았다.

1. 1999년 1월부터 2000년 12월 까지 서울시에 유통중인 식품 및 민원의뢰 도시락류 1,186건, 빵류 397건, 기타식품(집단급식소등) 387건, 냉동식품 459건, 축산물 330건을 사용하여 32주의 황색포도상구균을 검출하였다.
2. 독소성 쇼크 증후군 유전자가 검출된 균주는 3주(6%) 이었고, 크림빵, 감자샐러드, 떡볶이용 떡 이었다.
3. 분리된 황색포도상구균의 항생제 내성은 penicillin, polymyxin B 100%, ampicillin 81.2%, erythromycin 15.7%, kanamycin 9.3%, gen-

- tamicin 3.15%, Chloramphenicol 0% 이었다.
4. 분리된 황색포도상구균의 항생제 다제 내성은 5제 내성이 3.12%, 4제 내성이 25%, 3제내성이 56.25%, 2제내성이 15.62% 이었다. 다제내성형 태는 AM-GM-K-P-PB가 1주, AM-E-P-PB, AM-E-P-PB, AM-K-P-PB, AM-GM-P-PB가 8주, AM-P-PB, E-P-PB가 18주, P-PB가 5주 순이었다.
 5. 독소성 쇼크 증후군 독소 유전자는 식품분리주 32 중 3주가 검출되었고 *tst* 유전자를 보유하고 있는 것으로 확인됐다.

참고 문헌

1. Patrick R.Murray, Ellen Jo Baron, Michael A. Pfaller, Fred C. Tenover, Robert H. Yolken: Manual of Clinical Microbiology, 7th, ASM, p.265 (1999)
2. Dack, G. M., Carry, W.E., Woolpert, O., Wiggins, H.J : J. Prev. Med., 4:167 (1930)
3. Sugiyama, H. and T. Hayama: Abdominal viscera as site of emetic action for Staphylococcal Enterotoxin in the monkey. J. Infect. Dis. 115:330-336 (1965)
4. Evenson, M. L. W. M. Hinds, R. S. Bern-

- stein, and M. S. Bergdoll: Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxins A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 7:311-316 (1988)
5. Steven R. M., Gregory A. B.: Use of Multiplex PCR to detect classical and newly described pyogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J. of Clin. Microbiol.* 37(10): 3411-3414 (1999)
 6. Todd, J., M. Fishaut, F. Kapral, and T. Weich: Toxic-shock syndrome associated with phage group-1 staphylococci. *Lancet.* ii, 1116-1118 (1978)
 7. Bergdoll, M. S., A. Barbara, R. F. Crass, R. N. Reiser, and P. D. Jeffrey: A new Staphylococcal enterotoxin enterotoxin F associated with toxicshock-syndrome *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 1(8228):1017-1021 (1981)
 8. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4th ed., Approved standards M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. (1997)
 9. Karsten B., Ricarda R., Georg P.: Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus* use of two multiplex enzyme immunoassay for amplification and hybridization of Staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin Genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J. of Clin. Microbiol.*, 36(9):2548-2553(1998)
 10. Gerhard, T., Murray, P., Wood, W.A., and Krig, N.R.: Method for general molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington DC., (1994).
 11. 최영실: 국내 식품과 임상에서 분리된 황색포도상구균 병원성 인자들의 특성과 독소 유전자 cloning 및 발현, 성신여자대학교 대학원, 박사학위 논문, (2000)