

Original Article

Nasal Colonization of Serine Protease *esp*-Positive *Staphylococcus epidermidis* Affecting *Staphylococcus aureus* Colonization

Goeun Kang^{ID}, Hyun Soo Kim^{ID}, Han-Sung Kim^{ID}, Wonkeun Song^{ID}, Jae-Seok Kim^{ID}

Department of Laboratory Medicine, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

비강내 *Staphylococcus aureus*의 집락화와 *esp* 양성 *Staphylococcus epidermidis*의 영향에 대한 연구

강고은^{ID}, 김현수^{ID}, 김한성^{ID}, 송원근^{ID}, 김재석^{ID}

한림대학교 의과대학 진단검사의학교실

ABSTRACT

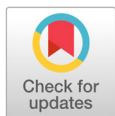
Background: *Staphylococcus aureus* is a common colonizer of the nasal vestibule and is found in approximately 20%–30% of healthy adults, while *Staphylococcus epidermidis* appears to be the most frequent colonizer in all regions of the upper respiratory tract. *Esp*, a serine protease of *S. epidermidis*, was reported to inhibit *S. aureus* colonization. This study was performed to examine the nasal colonization of *S. aureus* and *S. epidermidis* and the presence of *esp* determinants.

Methods: Nasal swab specimens from 54 patients were cultured on blood agar plates (BAP) and selective media for *S. aureus* (*S. aureus* ID, bioMérieux, France) for the isolation of *S. aureus* and *S. epidermidis*. After 48 hours of incubation of with BAP, three or four colonies suspected of being coagulase-negative staphylococci (CNS) were identified by MALDI-TOF MS (Bruker, Germany). Polymerase chain reaction (PCR) for *esp* was performed on all CNS isolates identified as *S. epidermidis*.

Results: Forty-three *S. epidermidis* strains were isolated from 18 (33.3%) of the 54 patients. Nine (50.0%) of the 18 patients carried *S. aureus*, while the other nine did not. Of the 36 *S. epidermidis* non-carriers, 13 (36.1%) were colonized by *S. aureus*. All *S. epidermidis* strains were confirmed by PCR to have *esp* determinants.

Conclusion: *S. epidermidis* colonization did not affect *S. aureus* colonization in the nasal cavity. All *S. epidermidis* strains harbored the *esp* gene. We could not find any differences in the nasal colonization rates of *S. aureus* according to the presence of *esp*-positive *S. epidermidis*. Further research on the characterization of *S. epidermidis* in Korea is needed to understand the association between *S. epidermidis* and *S. aureus* colonization.

Keywords: Colonization, *esp*, Serine protease, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*



OPEN ACCESS

pISSN : 2288-0585

eISSN : 2288-6850

Ann Clin Microbiol 2021 September; 24(3): 105-110
<https://doi.org/10.5145/ACM.2021.24.3.5>

Corresponding author

Jae-Seok Kim

E-mail: jaeseok@hallym.ac.kr

Tel: +82-2-2224-2327

Fax: +82-2-2224-2214

Received: July 09, 2021

Revised: July 19, 2021

Accepted: July 19, 2021

© 2021 Korean Society of Clinical Microbiology.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus*는 사람의 비강내에 주로 집락화하며, 20-30%의 사람은 비강내에 *S. aureus*를 보유하고 있다. 비강내에 *S. aureus*를 보균한 입원환자에서는 *S. aureus*에 의한 기회감염의 위험이 증가하며, 때로는 창상감염을 비롯한 심각한 감염을 일으키기도 한다[1,2]. 또한 환자 입원시 *S. aureus* 보균자를 검사하여 치료하게 되면 수술후 창상감염의 위험을 줄일 수 있다고 알려져 있다[3-5]. 일반적으로 세균의 비강 집락화에는 비강조직 부착능, 균 성장에 필요한 영양소, 항균물질 생성 등의 여러 요소가 작용하며 균주간 작용 또는 인체의 면역기능과의 작용 등 복잡한 상호작용이 관여한다[6]. 일부 *Staphylococcus* 균종은 다당류와 단백질, teichoic acid, 세포외 DNA 등의 복합체로 이루어진 생물막을 형성하면서 인체 방어기전이나 항생제, 소독제로부터 자신을 보호하는 기전이 알려져 있다[7].

*Staphylococcus epidermidis*는 주로 피부와 비강내에서 집락을 이루는데, serine protease의 일종인 Esp를 생성하는 *S. epidermidis*는 *S. aureus*의 생물막 생성을 억제하여 *S. aureus*가 비강내에 정착하는 것을 억제한다고 보고되었다[8,9]. Esp는 생물막 형성에 관련된 extracellular adherence protein, extracellular matrix protein-binding protein, fibronectin-binding protein A 및 protein A 등 여러 단백질을 분해할 수 있으므로[9], Esp를 생성하는 *S. epidermidis*의 특성을 이용하여 *S. aureus* 보균을 막거나 치료에 사용하려는 시도가 있다.

기존의 여러 연구를 통해 Esp 생성 *S. epidermidis*가 *S. aureus*의 비강내 집락 형성을 억제한다고 알려져 있으나, 국내에서는 *S. epidermidis* 임상 균주에 대한 esp 보유 여부에 대한 보고가 없다. 이 연구는 입원환자를 대상으로 *S. aureus*와 *S. epidermidis*의 비강내 보유 여부를 조사하고, *S. aureus* 보균 억제와 esp 양성 *S. epidermidis*의 연관성을 알아보고자 시행하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. 대상 및 검체

2014년 7월에서 9월까지 서울의 한 종합병원에 입원한 54명의 환자의 비강도말 검체를 blood agar plate (BAP)와 선택 배지인 *S. aureus* ID (SAID; bioMerieux, Marcy-l'Étoile, France)에 접종한 후 35°C, 호기성 배양환경에서 48시간 배양하였다. *S. aureus* 선택배지에서 *S. aureus*로 의심되는 초록색 균집락을 선택하였고, BAP에서 coagulase-negative staphylococci로 의심되는 흰색 균 집락 3-4개를 선택하여 BAP에 계대배양한 후 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; Bruker, Bremen, Germany)로 동정하여 *S. epidermidis*인지 확인하였다. 비강외에서 분리된 *S. epidermidis* 균주의 esp 유전자 여부를 조사하기 위해 동일 기간 다른 환자의 혈액에서 분리된 *S. epidermidis* 19 균주도 추가로 연구대상(KD-2015-01)에 포함하였다.

2. *Staphylococcus epidermidis* esp PCR

S. epidermidis esp (serine protease) polymerase chain reaction (PCR)은 기존 보고와 같이 시행하였다[8]. DNA 추출은 HiYield Genomic DNA Mini kit (RBC, New Taipei City, Taiwan)를 사용하였고, PCR primer는 Esp_F (TTTGGAGGTTATCATATGAAAAAGAG)와 Esp_R

(CTGAATATTATATCAGGTATATTGTTTC)를 사용하여 Solgent Taq polymerase kit (Solgent, Daejeon, Korea)로 95°C, 4분 반응 후 95°C, 30초, 48°C, 30초, 72°C, 40초 조건으로 30회 반복하고, 72°C, 4분간 반응하였다. 2% agarose gel로 전기영동 후 854 bp의 PCR 산물을 확인하였다.

3. 통계 분석

S. epidermidis 보균과 *S. aureus* 보균 자료로 chi-square test를 Sigma plot software 13.0 (Systat Software, Ekrath, Germany)으로 시행하였다.

RESULTS

대상군 54명 중 18명(33.3%)에서 *S. epidermidis*가 검출되었다. *S. aureus*는 54명 중 22명(40.7%)에서 검출되었다. *S. epidermidis* 보균자 18명에서는 9명 (50.0%)에서 *S. aureus*가 배양되었으며, *S. epidermidis* 비보균자 36명 중 13명(36.1%)에서 *S. aureus*가 배양되었다(Table 1). *S. epidermidis* 보균에 따른 *S. aureus* 보균자의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($P=0.493$). *S. epidermidis* 균주는 모두 *esp* 유전자가 검출되어서 *esp* 유전자 보유에 따른 차이도 관찰할 수 없었다.

S. epidermidis 균주에 대한 *esp* PCR 결과, *S. epidermidis*가 비강에서 분리된 18명에서 중복 균주를 포함하여 총 43개 *S. epidermidis* 균주를 전부 시행했는데, 모든 균주에서 *esp* PCR 양성을 보였다. 비교를 위해 다른 환자의 혈액에서 분리된 *S. epidermidis* 19 균주에서도 모두 *esp* PCR 양성을 보였다.

Table 1. Nasal colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* for its presence of *esp* gene (n = 54)

Groups		<i>S. aureus</i> colonization	
		Carrier (n = 22)	Non-carrier (n = 32)
<i>S. epidermidis</i> colonization	Carrier (n = 18)	9	9
	Non-carrier (n = 36)	13	23
<i>esp</i> -positive <i>S. epidermidis</i> colonization*	Carrier (n = 18)	9	9
	Non-carrier (n = 36)	13	23

*All the *S. epidermidis* isolates showed *esp* gene positivity by polymerase chain reaction (PCR).

DISCUSSION

*S. aureus*와 *S. epidermidis*는 비강내에서 흔히 분리되는 균종이며, *S. aureus* 보균자는 *S. aureus*에 의한 기회 감염의 위험이 높은 것으로 알려져 있다. *S. epidermidis*는 병원감염에 중요한 원인균 중의 하나로 카테터 연관 감염의 흔한 원인이다. *S. epidermidis*는 병원성이 강한 병독성 인자가 거의 없으며, 인체 피부 세균총에서 다른 세균과 균형을 이루면서 집락화한다[10]. 균 집락의 요인에 대해서는 세균간 또한 세균과 숙주간의 반응이 복잡하여 파악하기 쉽지 않지만, 병원성 미생물을 다른 미생물로 억제하는 여러 연구가 진행중이며, 최근에는 마우스 비강내 *S. epidermidis*가 면역반응을 유도함으로써 influenza virus에 대한 항바이러스 효과를 보인다는 연구도 시도하고 있다[11].

*S. epidermidis*의 serine protease인 Esp는 *S. aureus* 생물막을 분해하는 특성이 있어, *S. aureus*의 생물막 억제제로 사용 가능하다는 연구가 있다[8]. 즉 *S. aureus*의 생물막 형성을 억제하는 일부 *S. epidermidis*는 비강에서 *S. aureus*를 정착하기 어렵게 하므로, 이러한 균주의 보유자는 *S. aureus*의 비강 보균율이 낮으며, Esp를 *S. aureus*의 보균자 제균에 사용하고 나아가서 치료에 활용할 가능성

이 있다고 한다. 하지만, 국내의 임상분리 *S. epidermidis* 균주의 *esp* 유전자에 대한 조사는 거의 없다.

이번 연구에서는 환자의 비강 검체에서 *S. aureus*와 *S. epidermidis*를 배양하여, 각 균주의 보균이 영향을 주는지를 파악하고 *S. epidermidis* 균주에서 *esp* 유전자 유무를 조사하였다. 하지만, *S. epidermidis* 균주 모두에서 *esp* 유전자가 양성을 보였고 혈액내에서 분리된 여러 *S. epidermidis* 균주들도 모두 *esp* 양성을 보였으므로 *esp* 유전자는 대부분의 균주에서 보유하고 있을 것으로 추정된다. 따라서, *S. epidermidis* 균주의 *esp* 유무와 *S. aureus* 균주의 비강 정착의 연관성을 추정하기는 어려웠다. 향후 연구에서는 국내외의 *S. epidermidis*의 균주 특성을 감안해야 할 것으로 생각한다. 다만, 이 연구에서는 *esp* 유전자 유무를 조사하여 Esp 생성량 및 serine protease의 활성을 측정할 것은 아니므로 직접적인 비교는 어려운 한계가 있다.

비강내에는 다양한 미생물이 균총을 이루고 있으므로[1,6,12], 일부 특성을 가진 하나의 세균에 의해 다른 세균의 군집락화를 설명하기는 어려울 수 있다. *S. aureus*가 비강내에 집락화하는 경우 여러 인자의 영향을 받는데, 세균 요인으로는 *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium* spp. 등이 있고, 인체의 유전적 요인으로는 IL-4, Toll-like receptor 등이 있으며, 면역학적 요인으로는 TLR2나 antimicrobial peptide, 여러 항체 등이 있고, 연령, 성, 흡연 등도 관련이 있다[2]. 따라서, 이번 연구에서처럼 단일 균종의 단일 유전자 특성만으로는 연관성을 밝히기 어려울 수도 있다.

Esp와 *S. aureus* 집락에 미치는 영향을 처음 밝힌 논문에서는 *S. aureus* 생물막을 억제할 수 있는 *S. epidermidis*가 전체 *S. epidermidis*의 51.2%였으나[8], 이 균주들의 *esp* 유전자 유무를 제시하지는 않았다. 한편, 노르웨이의 건강한 청소년을 대상으로 한 연구에서는 *S. aureus*의 비강내 보유와 *S. epidermidis*의 생물막 억제능 사이에는 연관이 없었으며, *S. epidermidis* 배양 상층액이 *S. aureus*의 생물막을 억제하는 균주의 경우에서도 *S. aureus* 보균을 억제할 수 없었다고 하며[12], 이 둘 사이의 관계를 증명하기 위해서는 다양한 임상 연구가 필요할 것으로 보인다. 또한, 2019년에 미국에서 보고된 신생아 대상 연구에서도 비강내 *S. epidermidis*의 존재는 *S. aureus*의 집락화를 막는 효과가 있으나, Esp 이외의 다른 기전을 가지는 protease가 있을 것으로 추정된다고 하였다[13].

*S. aureus*의 비강 집락화를 억제하면, 환자의 내인성 *S. aureus* 감염을 줄일 수 있을 것으로 기대하고 있으며, *S. epidermidis*의 Esp가 *S. aureus*의 생물막 형성을 억제할 수 있다고 알려져 있으나, Esp의 발현량과 *S. aureus*의 생물막 억제에 대한 직접적인 영향은 아직 불분명하며, *S. epidermidis*의 3분의 2 정도 균주에서는 균주의 배양상층액이 *S. aureus* 성장을 억제하지 않지만 생물막은 억제한다고 하며, Esp 발현량과는 역시 무관하다고 알려져 있다[14]. 따라서, 비강내에서 *S. epidermidis*의 *S. aureus* 보균 억제능에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

이번 연구에서는 입원환자의 비강에서 *S. aureus*와 *S. epidermidis*의 보균 여부를 조사하고 비강내 *esp* 양성인 *S. epidermidis*와 *S. aureus*의 연관성을 살펴보고자 하였다. 그 결과, 대부분 *S. epidermidis*는 *esp* 양성을 보였으며, *S. epidermidis*의 *esp* 보유 여부는 *S. aureus*의 비강 집락에는 영향을 미치지 못하는 것으로 보인다.

요약

배경: *Staphylococcus aureus*는 건강인의 20%-30%의 비강에서 분리되는 상재균이며, *Staphylococcus epidermidis*는 상부 호흡기 여러 곳에서 가장 흔히 분리되는 세균이다. *S. epidermidis*에 있는 serine protease의 일종인 Esp는 *S. aureus*와 경쟁적으로 작용하여 *S. aureus*의 집락화를 억제한다고 알려져 있다. 이 연구는 비강내 *S. aureus*와 *S. epidermidis*를 배양하여 *S. epidermidis*의 집락화, 이 균주의 *esp* 유전자 보유 여부와 *S. aureus* 비강 집락화와와의 연관성에 대해 알아보려고 하였다.

방법: 54명의 환자에서 수집한 비강도말 검체를 혈액한천 배지와 *S. aureus* ID 선택 배지(bioMerieux, France)에 배양하였다. 혈액한천 배지는 48시간 배양하여 coagulase-negative staphylococci로 의심되는 집락 3-4개를 선택하여 MALDI-TOF MS (Bruker, Germany)로 균종을 확인하였다. *S. epidermidis*로 확인된 균주는 PCR로 *esp* 유전자를 검사하였다.

결과: *S. epidermidis*는 18명의 환자로부터 43 균주가 분리되었고, 18명 중 9명(50%)은 *S. aureus*를 보균하고 있었다. *S. epidermidis* 비보균자 36명 중에서는 13명(36.1%)에서 *S. aureus*가 분리되었다. *S. epidermidis* 모든 균주에서 *esp* 유전자가 검출되었다.

결론: 연구 결과 비강내 *S. epidermidis*의 집락화가 *S. aureus* 보균에 미치는 영향은 없었다. 모든 *S. epidermidis*가 *esp*를 가지고 있으므로, *esp* 유전자의 유무와 비강내 *S. aureus* 집락화는 연관성이 없는 것으로 보인다. 비강내 집락화 과정에서 *S. aureus*와 *S. epidermidis*의 상호작용에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

FUNDING

이 연구는 보건산업진흥연구원 (HI17C2067) 연구지원으로 수행되었음.

REFERENCES

1. Sakr A, Bregeon F, Mege JL, Rolain JM, Blin O. *Staphylococcus aureus* nasal colonization: an update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. *Front Microbiol* 2018;9:2419.
2. Mulcahy ME and McLoughlin RM. Host-bacterial crosstalk determines *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *Trends Microbiol* 2016;24:872-86.
3. Bode LGM, Kluytmans JA, Wertheim HF, Bogaers D, Vandenbroucke-Grauls CM, Roosendaal R, et al. Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 2010;362:9-17.
4. Perl TM. Prevention of *Staphylococcus aureus* infections among surgical patients: beyond traditional perioperative prophylaxis. *Surgery* 2003;134:S10-7.
5. Perl TM, Cullen JJ, Wenzel RP, Zimmerman MB, Pfaller MA, Sheppard D, et al. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 2002;346:1871-7.

6. Krismer B, Weidenmaier C, Zipperer A, Peschel A. The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:675-87.
7. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 2012;33:5967-82.
8. Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A, Seo H, Takada K, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 2010;465:346-9.
9. Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol* 2013;195:1645-55.
10. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:555-67.
11. Kim HJ, Jo A, Jeon YJ, An S, Lee KM, Yoon SS, et al. Nasal commensal *Staphylococcus epidermidis* enhances interferon-lambda-dependent immunity against influenza virus. *Microbiome* 2019;7:80.
12. Fredheim EGA, Flaegstad T, Askarian F, Klingenberg C. Colonisation and interaction between *S. epidermidis* and *S. aureus* in the nose and throat of healthy adolescents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:123-9.
13. Lee DC, Kananurak A, Tran MT, Connolly PA, Polage CR, Iwase T, et al. Bacterial colonization of the hospitalized newborn: competition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Pediatr Infect Dis J* 2019;38:682-6.
14. Martinez-Garcia S, Rodriguez-Martinez S, Cancino-Diaz ME, Cancino-Diaz JC. Extracellular proteases of *Staphylococcus epidermidis*: roles as virulence factors and their participation in biofilm. *APMIS* 2018;126:177-85.