

Epidemiological Investigation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Arbitrarily Primed PCR

Byoung-Seon Yang[†]

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains are resistant to a wide range of antibiotics and are a major cause of nosocomial infections. Accurate and rapid typing of MRSA is needed to implement effective infection control measures. Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) is a very useful method in rapid typing. AP-PCR is not necessary information about target DNA sequence because this is basically DNA amplification and could be useful in epidemiological typing by classified band pattern. In this study, MRSA were isolated and identified from ICU, Neu, IM and Ped environments and investigated molecular typing by AP-PCR. Ped, the MRSA pattern determines the Ia, IIa type, IM is Ib type, Neu is IIa type and ICU determines the IIa, IIb types. All MRSA in this study were typeable by AP-PCR, which was easy to perform and reproduce with evidence of MRSA for purposes of nosocomial infection control.

Key Words: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

서 론

Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 원내감염 원인균으로 세계적으로 중요하며 다양한 항생제에 대해 내성을 나타내는 균주이다 (Dixon, 1995; Noble et al., 1992). 특히 기존질환이 있고 장기입원 환자가 많은 중환자실에서의 감염은 높은 사망률을 나타내므로 그 심각성이 크다. MRSA에 의한 감염을 방지하기 위한 방법은 감염원을 제거하고 이미 감염된 환자 또는 건강한 보균자와 감염이 될 수 있는 환자를 격리하는 것인데 이를 위해서는 서로 다른 출처로부터 얻어진 균들을 정확히 분별해 낼 수 있는 검사법이 필수적이다. 병원감염균의 역학적 조사를 위한 방법으로 표현형과 유전자형에 의한 분류방법이 있는데 표현형에 의한 MRSA균주의 형별분류에는 항생제 감수성 검사, 생물형, 혈청형 등을 이용하며 (Kluytmans et al., 1997) 유전자형 (genotype)에 의한 방법으로 여러 가지 형태의 분자유전학적 기법 중에서 restriction fragment length polymorphisms (RFLP)와 pulse-field gel electrophoresis (PFGE), arbitrarily primed PCR (AP-PCR)방법 등이 이용되고 있다 (Rossney et al., 1994; Tenover et al., 1995). 그러나, 표현형은 많은 시간과 노동력을

요하며 재현성이 부족하여 균종간에 변별력 떨어져 때로는 부적절한 결과를 내기도 하며 (Van Belkum et al., 1993) 유전자형 PFGE의 경우 변별력은 양호하나 제한효소로 절단한 염색체 DNA를 전류의 방향을 주기적으로 바꾸면서 전기영동하는 등의 방법은 재현성과 변별력은 뛰어나나 특별한 장치가 필요하고 실험 소요시간이 3일 정도로 길어 일반적인 검사실에서 사용하기에는 어려운 점이 많다. AP-PCR방법은 한 개의 임의의 primer를 이용하여 증폭된 DNA의 단편들의 다형성을 관찰하는 방법으로 유전자 연관 지도 작성에 응용되고 있다 (Tenover et al., 1995). AP-PCR방법은 분자역학적 형별 구분방법으로서 이용하기 쉬우며 다양한 세균에 대해서 동일한 primer를 이용하여 시도해 볼 수 있고, 하나의 primer만 이용한 반응에서 균주 사이의 분별력이 높은 결과를 보고하고 있다 (Van Belkum et al., 1993). 병원환경에서 동일한 균종이 일정한 기간 동안에 통상적인 분리비율보다 높게 분리되거나 한 장소에서 지속적으로 다수의 환자로부터 분리되면 병원감염이 발생하였거나 그 병동의 환경에 병원감염균의 클론을 추정할 수 있다 (Frenay et al., 1994; Horan et al., 1992). 병원감염 균주에 적절한 분자유전학적 구별방법을 이용하여 동일한 클론에 의한 감염을 확인하고 감염원을 밝혀 더 이상 병원감염이 발생하지 않도록 조치를 취할 수 있다. 본 연구에서는 종합병원의 환경에서 MRSA를 분리하고 AP-PCR방법을 이용하여 형별분류와 역학조사방법으로서의 유용성을 알아보고 감염원을 규명하고자 하였다.

* 논문 접수: 2004년 11월 2일

수정재접수: 2004년 12월 10일

[†] 교신저자: 양병선, (우) 660-757 경남 진주시 상봉서동 1142번지, 진주보건대학 임상병리과

Tel: 055-740-1851, Fax: 055-740-1846

e-mail: ybseon@chc.ac.kr

Table 1. Oligonucleotide primers for AP-PCR analysis for MRSA

Primer	Sequence	GC content
OPA2	5-TGC-CGA-GCT-G-3	70%
OPA3	5-CAG-CAC-CCA-C-3	70%
OPA4	5-AGG-TGA-CCG-T-3	60%

재료 및 방법

1. 사용 균주

병원내 환경에서 분리한 *S. aureus* 10개 균주를 대상으로 하였다. 균주의 배양은 항생제 내성 균주들을 분리하기 위해 oxacillin (4 µg/ml)이 첨가된 영양 한천 배지를 사용하였으며, 분리 균주들의 항생제 감수성 검사를 위한 기본 배지는 Muller-Hinton 배지를 사용하였다. DNA추출을 위한 배지로는 Tripcase soy broth를 사용하였다.

2. Oligonucleotides

Primer는 Operon사의 10 mer A kit 20가지 primer 중에서 Van Belkum 등의 문헌을 참조하여 Table 1과 같이 OPA2, OPA3, OPA4를 Bioneer, Inc.에 각 primer를 주문하여 사용하였다.

3. 생리·생화학적 특성

분리된 균주의 용혈성 유무를 관찰하기 위해서 BAP (blood agar plate)에 접종하여 37°C 배양기에 24~48시간 배양한 후 집락 주위의 용혈성 유무를 판정하였고, 7.5% sodium chloride가 함유되어 있는 mannitol salt agar plate (BBL)에 접종하여 37°C 배양기에 24~48시간까지 배양하여 mannitol 분해능을 관찰하였다. 집락 주위의 색이 완전히 노란색으로 변하였을 경우 양성으로, 색이 변하지 않았을 경우 음성으로 판정하였다. 또한 3 ml test tube에 heparin 처리된 혈장 0.5 ml을 넣고 1 loop의 균을 푼 다음 37°C 배양기에서 24시간 배양하여 coagulase 검사를 하였다. 응고된 것은 양성, 응고되지 않는 것은 음성으로 판정하였으며, *Staphylococcus*속과 *Streptococcus*속을 구별하기 위해 3% 과산화수소로 catalase 생성을 보았다. 고형 배지상의 신선 배양균을 섞어서 기포가 발생하면 양성으로, 기포가 발생하지 않으면 음성으로 판정하였다.

4. 미생물 자동화 동정기기에 의한 동정

생화학적 특성 조사는 미생물 자동화 동정기기인 ATB Expression system (BioMerieux)를 이용하여 시험하였다. 3% NaCl 영양 한천 배지에서 생성된 집락을 백금이를 사용하여 McFarland 0.5 표준농도로 조절하여 ID 32 STAPH 동정 kit에 접종하고 35°C에서 2일간 배양 후 결과를 ATB reader을

이용하여 동정하였다.

5. 항생제 감수성 검사

2% NaCl이 함유되어 있는 Muller-Hinton broth를 이용한 액체 희석법으로 oxacillin을 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml의 농도가 되도록 첨가하여 항생제 감수성 시험을 위한 배지를 조제하였다. 각각의 항생제가 첨가된 broth에 18시간 배양된 균주들을 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 관찰하였다.

6. AP-PCR

배양된 균을 모아서 lysis용액 [0.1 M Tris (pH 7.5), 1.5 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 0.1% NaCl, 200 µg/ml proteinase K, 10 µg/ml lysostaphin] 30 µl에 현탁 후, 60°C에서 10분간 반응시킨 다음 95°C에서 5분간 가열시킨 후 10,000 x g으로 10분간 원심분리하여 상층액을 DNA용액으로 사용하였고 (Boom et al., 1990), PCR을 위한 혼합액은 dNTP (2.5 mM) 4 µl, 10 x Buffer 2 µl, Primer (100 pmol) 각각 1 µl, genomic DNA (25 ng) 1 µl, Taq DNA polymerase (2 unit) 1 µl, 그리고 반응 용액이 20 µl 되게 증류수를 넣어서 제조하여 PCR을 실시하였다. DNA thermal cycler (Perkin Elmer)에서 denaturation은 94°C에서 5초, annealing은 36°C에서 30초, extension은 72°C에서 60초의 순서로 35회를 시행하고 72°C 5분간 final extension하였다. PCR 증폭산물을 1.5% agarose gel, 0.5 x TBE buffer에서 70 volt, 100 mA로 3시간 동안 전기영동을 실시한 다음, gel은 ethidium bromide에서 20분간 염색하고 증류수에 10분간 탈색하여 UV transilluminator로 관찰하고, polaroid camera로 사진을 촬영하였다.

7. Computer analysis

각 시험 균주간의 유사도 측정을 위하여 사진 상에 나타난 PCR 생성물을 각각의 하나의 형질로 간주하여 생성된 band의 유무에 따라 1과 0으로 표시하여 data matrix를 작성하고 통계처리 프로그램인 MVSP (MultiVariate Statistics package Version 3.1)를 이용하여 UPGMA법으로 Jaccard's coefficient를 산출하고 이를 바탕으로 각 시험 균주간 similarity matrix를 작성하고, plot program을 이용하여 시험 균주의 phenogram을 작성하였다.

결 과

1. 분리 균주의 생리 생화학적 특성

분리된 10개 균주는 coagulase 양성, catalase 양성, 용혈성 시험 양성, mannitol 분해 양성으로 나타났고, ID 32 STAPH 동정 Kit를 사용하여 *S. aureus* 균주를 확인 동정하였다.

Table 2. MIC(S) of *Staphylococcus aureus* for susceptibility test) Concentration ($\mu\text{g/ml}$) of oxacillin

Strains	Concentration ($\mu\text{g/ml}$) of oxacillin								
	4	6	8	10	20	30	40	50	100
<i>S. aureus</i> KCTC1928	+	-	-	-	-	-	-	-	-
KH1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KH2	+	+	+	+	-	-	-	-	-
KH3	+	+	+	+	-	-	-	-	-
KH4	+	+	+	+	-	-	-	-	-
KH5	+	+	+	-	-	-	-	-	-
KH6	+	+	+	-	-	-	-	-	-
KH7	+	+	+	+	+	+	-	-	-
KH8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KH9	+	+	+	-	-	-	-	-	-
KH10	+	+	+	-	-	-	-	-	-

MIC, minimum inhibition concentration; +, growth; -, no growth

Table 3. AP-PCR genotyping of MRSA from various isolated

Strains	Ward	Site of isolation	AP-PCR type
KH	Ped	knob	Ia
KH2	ICU	corridor	IIa
KH3	ICU	knob	IIa
KH4	IM	toilet	Ib
KH5	NS	floor on the bed	IIa
KH6	NS	knob	IIa
KH7	IM	corridor	Ib
KH8	ICU	toilet	IIb
KH9	NS	side table	IIa
KH10	Ped	corridor	IIa

Ped, pediatrics; ICU, intensive care unit; IM, internal medicine; NS, neurosurgery

2. 항생제 감수성

액체 희석법에 의한 항생제 감수성 시험을 실시하였으며, Oxacillin에 감수성은 $4 \mu\text{g/ml}$ 이하, 내성은 $6 \mu\text{g/ml}$ 이상에서 성장한 균주로 결정하였다. 실험된 10균주가 oxacillin 내성 균주로 나타났다 (Table 2).

3. MRSA의 AP-PCR 양상

각각의 primer를 사용하여 실험한 결과 OPA4 primer는 MRSA에 대하여 평균 11~18개의 band를 형성하여 균종간 및 균주간 변별력이 양호하였고 OPA2 primer는 평균 5~8개의 band를 보여 이중에서 KH1, 2는 OPA3 primer와 동일한 양상을 보였으나 다른 균주들은 조금씩 달랐다. OPA1 primer는 평균 12~18개의 band를 형성하여 KH균주들의 대부분이 OPA4 primer와 유사하였고 일부 균주들은 증폭산물이 매우

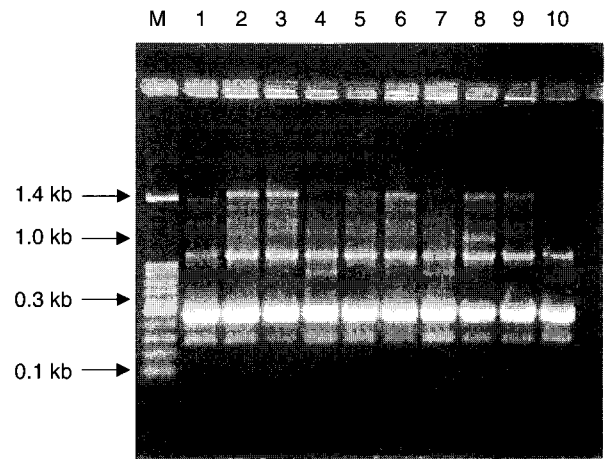


Fig. 1. AP-PCR patterns of MRSA isolates produced by primer OPA4. Lane M, molecular size marker; lane 1, KH1; lanes 2 to 3, KH2 to 3; lanes 4, KH4; lanes 5 to 6, KH5 to 6; lane 7, KH7; lane 8, KH8; lanes 9 to 10, KH9 to 10.

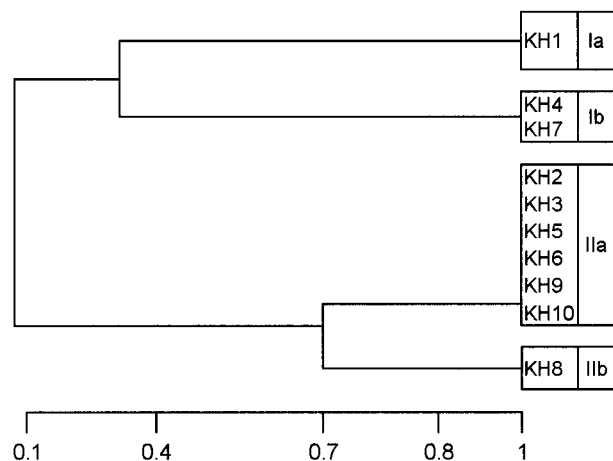


Fig. 2. Dendrogram showing the cluster analysis results for 10 strains of MRSA by AP-PCR patterns with primer OPA4.

약하거나 형성되지 않았다. 병원환경에서 분리 균주의 분리에 대하여 genotype에 의한 유연관계를 조사한 결과 MRSA 10균주의 AP-PCR를 이용한 균종간의 분류에서 MRSA균주는 모두 4군으로 분류되었으며 KH1를 Ia군, KH4를 Ib군, KH2, 3, 5, 6, 9, 10균주는 IIa군, KH8은 IIb군으로 나눌 수 있었다 (Table 3, Fig. 1). Ia형의 유사도는 0.48~1.00, Ib형은 0.50~1.00, IIa형은 0.67~1.00, IIb형의 0.29~1.00의 유사도를 보였다. 본 실험에서는 균 종간의 차이가 명확하였고, 재현성을 알아보기 위하여 동일한 환경에서 각각 분리한 KH5 및 KH6균주를 비교한 결과 IIa형 (유사도 1.00)으로 동일 균주로 판명되었고 (Fig. 2), 1차 분리한 genomic DNA와 1개월 뒤인 2차에 분리한 genomic DNA로 AP-PCR을 시행하여 비

교한 결과 양호한 재현성을 보였다.

고 찰

병원감염이란 입원 당시 혹은 잠복기에 있지도 않았던 감염이 입원 환자에서 발생하는 것으로 정의하며, 원내감염은 여러 가지 경로를 통하여 발생하나 최근 각종 소독, 멸균법과 항생제의 개발 그리고 일회용품 등의 사용으로 과거보다 위생적인 환경에도 불구하고 면역억제제의 사용, 장기이식 등에 각종 시술 또는 검사에 침습적 처치가 증가함으로 인하여 오히려 병원감염이 증가하고 있으며 (Gakuu, 1997) 특히 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 원내감염 세균으로 중요시되고 있으며 심각한 문제가 되고 있다. MRSA는 중환자실 환자들은 높은 병원감염에 이환을 보이고, 일단 감염이 발생하면 40%가 사망하는 등의 심각한 결과를 초래한다. 또한 이들 MRSA는 같은 속내에서 내성이 빠르게 전파되고 있고, 다수의 국외 연구에서는 특정 MRSA 균주가 병원간 전파되고 있다고 보고하고 있으며 (Nur et al., 1996), 또한 대륙간 전파를 보고한 연구도 있다 (Rossney et al., 1994). 전파경로에 대해선 의료인이나 환자의 교류를 통한 전파가능성을 제시한 연구도 있는 반면, 넓은 지역에 걸친 전파와 대륙간 전파가 가능하려면 의료인이나 환자보다는 지역사회를 통한 전파가 있을 것이라고 추정하기도 한다. 따라서 이들 균주에 대한 빠른 진단에 의한 감염의 확산 및 속내 전파를 막는 것이 중요시 되고 있으며, 감염질환의 역학적 조사에 표준화된 방법이 절실히 필요하다. 최근 분별력이 뛰어나 가장 선호되는 역학적 타이핑 방법으로 PFGE가 이용되고 있으나 특별한 장비와 시간과 비용이 많이 소요된다. 역학조사의 도구로서의 유용성은 간편하고 신속하게 감염원을 선별하는 방법으로 요약되어지는데 이러한 조건을 만족시킬 수 있는 방법은 없다. 그러나 주어진 역학적 조건 하에서 가장 적절한 방법은 실제로 시행하여 검사가 잘되는 방법이라고 하였다 (Rossney et al., 1994). AP-PCR방법은 PFGE에 비해 검사 시간이 짧고, 특별한 장비가 필요하지 않아 역학조사에 많이 이용되고 있는 기법이다 (Versalovic et al., 1991). 병원환경에서 MRSA균주의 유전형 분석 결과 중환자실환경 복도와 문고리에서 분리한 KH2, 3균주는 IIa형으로 각각 분리한 균주가 동일한 균주로 추정되었으나 화장실환경에서 분리한 KH8균주는 IIb형으로 다른 양상을 보였다. 소아과 환경 문고리와 복도에서 분리한 KH1, 10균주는 각각 Ia형과 IIa형으로 다른 양상을 보였다. 내과환경화장실과 복도에서 분리한 KH4, 7균주는 Ib형으로 동일한 균주로 추정되었다. 신경외과환경 침대바닥, 문고리 그리고 side table에서 분리한 KH5, 6, 9균주는 IIa형으로 동일한 균주로 판명되었다. 본 연구 결과 IIa형에 속하는 6균주 (KH2~3, KH5~6,

KH9~10) 중 KH5, KH9균주는 중환자실 환경에서 신경외과 환경으로 이설하였으며 공동 오염원에서 유래한 동일 클론에 의한 감염을 추정할 수 있었다. 최근 CDC에서는 MRSA의 타이핑에 30년간 기준검사법으로 사용해 오던 파지형별법 대신에 PFGE를 기준법으로 할 것을 제시하였다. 앞으로 역학적으로 관련된 균주들에 대해 추가적인 시간과 노력을 들여서 다양한 방법의 유전자형을 이용한 세균형별을 지속적으로 연구하여 병원내 감염의 전파를 차단할 수 있는 대책이 수립되어야 할 것이다.

REFERENCES

- Boom RC, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim Van Dillen, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990. 28: 495-503.
- Dixon RE. Cost of nosocomial infections and benefits of infection control programs. 1995. p.19-25. In R. P. Wenzel(ed.), Prevention and control of nosocomial infections. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, Md.
- Frenay HM, Theelen LM, Schouls CM, Vandenbroucke-Grauls JC, Verhoef WJ, Mooi FR. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphisms. *J Clin Microbiol.* 1994. 32: 846-847.
- Gakuu LN. Review of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with special reference to handling of surgical patients. *East Afr Med J.* 1997. 74: 198-202.
- Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Emori TG. CDC definitions of nosocomial surgical site infections. A modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1992. 17: 780-795.
- Kluytmans JA, van Belkum A, Verbrugh HA. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997. 10: 505-520.
- Noble WC, Virani Z, Cree RGA. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992. 93: 195-198.
- Nur YA, Vandenbergh MFQ, Yusuf MA, Verbrugh HA. Nasal carriage of multi resistant *Staphylococcus aureus* among health care workers and pediatric patients in two hospitals in Mogadishu, Somalia. *Int J Infect Dis.* 1996. 1: 186-191.
- Rossney AS, Coleman DC, Keane CT. Evaluation of an anti-biogram-resistogram typing scheme for typing scheme for

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol. 1994. 41: 441-447.
- Tenover FC, Arbert RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995. 33: 2233-2239.
- Van Belkum A, Bax R, Peerbooms P, Goessens WHF, Quint WGV. Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1993. 31: 798-803.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 1991. 19: 6823-6831.