

# 닭에서 분리된 methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci의 동정 및 staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type

공신국\* · 육심용 · 이건설 · 김소연<sup>1</sup> · 홍영운 · 정유태 · 이정화<sup>1</sup>  
김희정<sup>1</sup> · 황수명<sup>1</sup> · 장경수<sup>1</sup>

충청남도 가축위생연구소 부여지소, <sup>1</sup>부산가톨릭대학교 임상병리학과

(접수 2009. 11. 25, 게재승인 2010. 9. 16)

## Identification and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from chickens

Shin-Koog Kong\*, Sim-Yong Yook, Geon-Taek Lee, So-Yeon Kim<sup>1</sup>,  
Young-Un Hong, Yoon-Taek Jung, Jung-Hwa Lee<sup>1</sup>  
Hee-Jeong Kim<sup>1</sup>, Soo-Myung Hwang<sup>1</sup>, Kyung-Soo Chang<sup>1</sup>

Buyeo-branch, Chungnam Veterinary Research Institute, Buyeo 323-808, Korea

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory Sciences, Catholic University of Pusan 609-757, Korea

(Received 25 November 2009, accepted in revised from 16 September 2010)

### Abstract

Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS) were isolated from the respiratory sites of chickens in 4 farms and slaughter house located in Chungnam provinces. Isolation of coagulase-negative staphylococci (CNS) was positive for 61 (26.6%) of the 229 chickens tested, and isolation of MRCNS was positive for 17 (27.9%) of the isolated CNS. A total of 17 MRCNS isolates were selected and subjected to identification. Of the 17 MRCNS isolates selected, 6 were identified as *Staphylococcus cohnii*, 2 as *S. saprophyticus*, 3 as *S. simulans*, 3 as *S. lentus*, 2 as *S. carnosus*, and 1 as *S. xylosum*. The MRCNS isolates were resistant to many beta-lactam antibiotics, and some isolates were also resistant to macrolide and aminoglycoside antibiotics. The *mecA* gene was detected in some isolates of each MRCNS strains. The *mecA*-positive isolates were classified into five staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*). SCC*mec* types I to IV were detected in isolates from chickens.

**Key words** : Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS), Staphylo-coccal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type, Chicken

\*Corresponding author: Shin-Koog Kong, Tel. +82-41-833-8611,  
Fax. +82-41-830-2784, E-mail. kinkong@korea.kr

## 서 론

사람과 동물에서 *Staphylococcus*속균에 의한 감염은 매우 중요하다(Aarestrup 등, 2000; Awan과 Matsumoto, 1998; Cha 등, 2009). *Staphylococcus* spp.는 크게 coagulase-positive staphylococci (CPS)와 coagulase-negative staphylococci (CNS)로 분류되며 *S. aureus*는 CPS의 대표적인 세균으로 면역능이 있는 환자의 피부나 다른 기관에 감염을 야기하며, 특히 CNS는 면역능이 약화된 환자나 catheter를 사용하는 환자의 감염경로에 자연적으로 포함되는 균과 인간과 포유동물의 정상세균총을 형성하고있다(Kaszanyitzky 등, 2004; Martins와 Cunha Mde, 2007). Kloos와 Bannerman (1999)에 의하면 인간에게 감염하는 주요 *Staphylococci*에는 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. caprae*, *S. lugdunensis*와 *S. schleiferi*가 있다. CNS와 *S. aureus*는 사람의 원내감염에 주요 원인이며, CNS 중에는 *S. epidermidis*가 가장 많이 분리되었다(Kloos와 Bannerman, 1999; McNamee와 Smyth, 2000; Vuong와 Otto, 2002).

Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)는 전 세계적으로 원내감염을 야기하며 methicillin과  $\beta$ -lactam계 항생제들에 대하여 내성을 나타낸다. MRSA는 병원에서 원내감염뿐만 아니라 지역사회감염(community associated, CA-MRSA)의 대부분을 차지하고 있으며 원내감염에서 검출되는 세균 중 50% 이상이 포도상 구균이다. 이중 60% 이상이 MRSA로 중환자실에서 발견되는 균주의 95% 이상을 차지하고 있다(Cha 등, 2009; Kawano 등, 1996; Kloos와 Bannerman, 1999).

Methicillin은  $\beta$ -lactam계 항생제로 페니실린-결합 단백질(penicillin-binding protein, PBP)과 결합을 형성한 후 이 단백질의 활성을 제거함으로써 효력을 나타낸다(Cha 등, 2009; Kaszanyitzky 등, 2004). 그러나 MRSA는 *mecA* (methicillin resistant determinant) 유전자를 가지고 있어 이 유전자가  $\beta$ -lactam계 항생제에 의해 영향을 받지 않는 변종 페니실린-결합 단백질인 PBP2a 또는 PBP2b가 생성되기 때문에 약물 저항성이 나타난다(Cha 등, 2009; Kaszanyitzky 등, 2004; Kloos와 Bannerman, 1999; Lindsay, 2008). *mecA*가 포도구균 사이를 자유롭게 왕래하는 이동성 유전자인 포도상 구균

카세트 염색체(*Staphylococcus* cassette chromosome, SCC)에 위치하며 이를 SCC*mec*이라 부른다. SCC는 DNA 단편인데 황색포도구균 전체 염색체의 불과 2%에 해당하는 크기로 거기에 100종 이상의 유전자가 올라갈 수 있다. 현재 밝혀진 SCC*mec* type은 5종으로 *mecA* 유전자 복합체와 chromosomal cassette recombinase (*ccr*) 유전자 복합체의 조합에 따라 I에서 V type이 있으며, 여러 subtype으로 분류되며, SCC*mec* type에 따라 원내감염 및 지역사회 관련 MRSA 균주의 상관관계에 대한 특성이 밝혀지고 있다(Cha 등, 2009; Kaszanyitzky 등, 2004; Kloos와 Bannerman, 1999). 또한 methicillin 내성을 증가시키는 보조 유전자인 factor essential for methicillin resistance A (*femA*) 유전자는 *mecA*와 협조하여  $\beta$ -lactam계 항균제에 대한 내성을 나타낸다. *femA*는 다른 *Staphylococcus* 균종에는 존재하지 않고 *S. aureus*에만 존재한다. MRSA는 비  $\beta$ -lactam계 항균제에도 다양한 내성 pattern을 나타낸다(Kaszanyitzky 등, 2004; Kloos와 Bannerman, 1999).

동물에서 MRSA는 유방염에 걸린 소의 우유에서 처음으로 분리보고 되었으며(Devriese, 1975), 1996년 일본에서 닭의 콧구멍과 피부에서 methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS)를 분리보고(Awan과 Matsumoto, 1998; Forder 등, 2008; Kawano 등, 1996; Lindblad 등, 2006; Pepe 등, 2006) 하였으나 호흡기기관(기관지나 폐)에서 MRCNS 분리에 대한 보고는 부족한 실정이다. 닭에서 분리된 MRCNS에서 *mecA* 유전자는 검출하였으나 SCC*mec* type 분석은 실행되지 않았다. 특히 국내에서는 닭에서 MRCNS에 대한 보고가 없었으며 이에 대한 역학조사가 필요하다(Aarestrup 등, 2000; Awan과 Matsumoto, 1998; Forder 등, 2008; Kawano 등, 1996).

이에 이 연구에서는 충남에 위치한 4개의 양계장과 1개의 도계장의 닭의 호흡기 가검물로부터 mannitol salt agar를 이용하여 staphylococci를 분리하고, 자동미생물분리동정법으로 균을 동정하였다. 한편 coagulase test를 통하여 CNS를 분리하였고, 항생제 감수성검사를 통하여 MRCNS를 분리하였으며, PCR법으로 *mecA* 유전자를 확인후 SCC*mec* type을 결정하였다.

## 재료 및 방법

### 가검물 및 *Staphylococcus* spp. 분리

충남에 위치한 4개의 양계장과 1개의 도계장에서 총 229마리의 닭의 호흡기로부터 가검물을 채취하였으며 채취된 가검물은 *staphylococci*를 분리하기 위하여 *staphylococci* 선택배지인 mannitol salt agar (MSA, BD, USA)와 blood agar에 접종하여 37°C incubator에서 18~24시간 배양하였으며 mannitol salt 분해능 및 용혈성을 보고 *staphylococci* 집락을 선별하였다. *Staphylococci*는 MSA에 배지에서 모두 노란색 집락을 나타내었다.

### Coagulase test

MSA에서 노란색 집락을 선별하여 nutrient agar (NA, BD, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였으며 coagulase test를 위해 NA 배지에 자란 집락을 brain heart infusion (BHI) broth (BD, USA) 5ml에 접종하여 37°C에서 shaking incubator에서 하룻밤 배양하였다. Coagulase 검사는 Cha 등(2009)의 방법을 이용하였으며, 약술하면, 다음과 같다. BHI broth에서 배양된 균 배양액 0.1ml를 새로운 5ml BHI broth에 접종하여 4~5시간 배양하여 균의 농도가 10<sup>8</sup> CFU/ml 되게 조정하고, 12,000rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 그 상층액을 분석시료로 사용하였다. U-microplate (Greinerbio, USA) 각 well에 항 혈청형 8종을 각각 10μl 집어넣고 시료 10μl를 각 항혈청이 들어있는 well에 가하여 가볍게 혼합한 다음 실온에서 5분 방치하였다. 그 다음으로 PAF 기질용액을 각 well에 20μl 넣은 후 37°C에서 2시간 이후부터 30분 간격으로 형특이 coagulase와 항혈청간의 중화 반응에 의한 응고억제반응 여부를 관찰하였다.

### 항생제 disk를 이용한 MRCNS의 분리

Methicillin resistant *Staphylococcus*를 분리하기 위하여 disk diffusion 법(Kirby-baur법)을 이용하였다. 항생제 검사에 배지는 Müller-Hinton agar (BD, USA)나 BAP를 사용하였으며 tryptic soy broth (TSB, BD, USA)에 균을 풀어 1~2시간 배양 후 MacFarland No. 0.5의 탁도로 세균부유액을 만들었다. 이를 면봉으로 Müller-

Hinton agar 배지상에 고르게 도말한 후 penicillin, methicillin과 oxacillin 항생제 disk를 올려놓고 35°C에서 18~24시간 배양하여 억제대의 직경을 관찰해 감수성여부를 확인하였다. 항생제 내성을 보이는 균주를 methicillin 내성균주로 판정하였다.

### 분리균주의 동정 및 항생제내성유형

선발된 MRCNS는 자동미생물동정기인 Vitek GPI (bioMerieux, France)을 사용하여 균을 동정하였으며 의심되는 세균은 16s RNA를 이용한 genotyping을 실시하였다. 세균을 정확히 동정한 후 통계적으로 세균 분리를 계산하였다. 그리고 MRCNS에 대한 항생제 내성 pattern를 분석하기 위하여 Vitek GPS-450과 451 kit (bioMerieux, France)를 사용하여 MIC와 항생제 내성을 결정하였다.

### Genomic DNA 추출

TSB에 균을 풀어 37°C에서 24시간 배양 후 균주 배양액을 12,000rpm에서 10분간 4°C에서 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후 0.15% lysosome solution 300μl를 첨가하고 vortex하고, shaking incubator에서 37°C에서 1시간 배양하였다. 10% SDS 300μl를 첨가한 후 -70°C와 65°C에서 15분씩 각각 3회 반복하였다. Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCI, 25:24:1) 700μl를 첨가 후 12,000rpm에서 15분간 원심하였다. 상층액을 새 tube에 옮긴 후 PCI 700μl를 섞고 12,000rpm에서 10분간 원심하였다. 상층액을 취해 상층액의 2배의 100% ethanol을 첨가한 후 -20°C에서 2시간 보관하였다. 12,000rpm에서 30분간 4°C로 원심한 후 상층액을 버리고 진공건조한 후 증류수에 녹여 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

### Plasmid DNA 추출

TSB에 균을 풀어 37°C에서 24시간 배양 후 균주 배양액 1.5ml microtube에 1ml 가량 옮기고, 12,000rpm에서 5분간 4°C에서 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 하층 pellet에 D.W 300μl를 첨가한 후 vortexing 하였다. 100°C hot block에 쪼개 두고 5분간 가열한 후 ice에서 2분간 배양한 후, 12,000rpm에서 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새 tube에 옮긴 후 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

**Table 1.** Primers and predicted sizes of PCR products for SCCmec typing

Locus	Primer names	Primer sequence	Amplicon sizes (bp)	SCCmec type
MecA	Mec F	ACTGCTATCCACCCCTC	287	MecA
	Mec R	ACGTTGTAACCACCCC		
A	CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	I
	CIF2 R2	ATTACCACAAGGACTACCAGC		
B	KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGCCGA	284	II
	KDP R1	ATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
C	MEC1 P2	ATCAAGACTTGCATTTCAGGC	209	II, III
	MEC1 P3	GCGGTTTCAATTCACTTGTC		
D	DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	I, II, IV
	DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
E	RIF4 F3	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG	243	III
	RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
F	RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	III
	RIF5 R13	GTCACAGTAATTCCATCAATGC		
G	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	381	IA
	pUB110 R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC		
H	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	303	IIIA
	pT181 R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC		

## PCR

Methicillin 내성유전자인 *mecA* 유전자를 검출하기 위해 *mecA* 유전자에 대한 primer를 GenBank의 염기서열을 이용하여 Bio ToolKit 320 (Chang Bioscience, Castro Valley, CA)의 Primo DOP 3.4 (Chang Bioscience, Castro Valley, CA)를 이용하여 제작하였다(Table 1). PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR Premix (Bio-ner Co. Ltd. Seoul, Korea)를 사용하여, DNA 시료 (25ng) 0.5 $\mu$ l, primer (10pM)를 각각 1 $\mu$ l 넣고 증류수로 총 20 $\mu$ l로 희석하였다. PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 반응, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분의 과정으로 30회 반복하였고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분 연장으로 PCR반응을 종결하였다. 증폭된 DNA 시료는 1.5% agarose gel을 통하여 전기영동을 실시하였고, 각 증폭산물을 정제하여 염기서열분석을 실시하였으며 얻어진 염기서열이 *mecA* 유전자와 동일할 경우 *mecA* 유전자 양성으로 결정하였다.

## SCCmec 유전자형 분석

SCCmec 유전자형 분석은 Cha 등(2009)의 방법에 따라 genomic DNA (50ng)를 사용하여 Mec A, B, C, D, E, F, G, H 8종의 특히 primer (10pM)와 AccuPower PCR premix를 사용하여 증류수로 총 20 $\mu$ l로 희석하여 PCR를 수행하였다(Table 1). PCR 반응조건으로는 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation하였으며, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 과정을 30회 반복하였으며, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 연장하여 PCR를 종결

**Table 2.** Isolation frequency of coagulase-negative Staphylococci (CNS) from chicken in a flocks of farm and places of slaughter house

Isolate	Slaughter house (%)	Farm (%)	Total (%)
CNS	57* (93.4)	4 (6.6)	61 (100)

\*Numbers of strains

**Table 3.** Isolation frequency of MSCNS or MRCNS from chicken in a flocks of farm and places of slaughter houses

CNS	Slaughter houses (%)	Chicken farms (%)	Total (%)
MSCNS	43* (75.4)	1 (25.0)	44 (72.1)
MRCNS	14 (24.6)	3 (75.0)	17 (27.9)

\*Numbers of strains

하였다. 증폭된 DNA 시료는 1.5% agarose gel을 통하여 전기영동을 실시하여 특히 band가 관찰되었을 때 양성으로 판정하였다.

## 결 과

### 닭에서 CNS의 분리율

충남에 위치한 양계장 및 도계장의 닭 229마리를 선택하여 호흡기 부위로부터 가검물을 채취하여 MSA배지를 이용하여 *Staphylococcus*속 균을 분리하였다. 61마리의 닭에서 노란색 집락을 선별되어 26.6%의 *Staphylococcus*속 균이 분리되었으며, coagulase 검사를 실시한 바, 61 분리주 모두 coagulase 음성을 나타내어 CNS로 판명되었다(Table 2). 양계장에서 보다 도계장

에서 더 많은 CNS가 분리되었다.

**닭에서 MRCNS의 분리율**

Penicillin, methicillin 그리고 oxacillin 항생제 disk를 이용한 Kirby-baur법으로 61주에 대한 항생제 감수성을 검사한 결과 17주가 penicillin, methicillin 및 oxacillin에 대한 내성을 나타내어 27.9%의 MRCNS 분리를 나타내었다(Table 3).

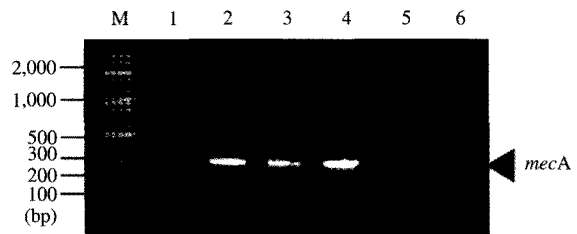
**닭에서 MRCNS의 동정**

농가 및 도계장에서 분류된 검체(닭)에서 MRSNS로 분리된 17균주에 대한 미생물 자동분석기를 이용하여 세균에 대한 동정을 실시한 바, *S. cohnii*가 6주, *S. simulans*가 3주, *S. lentus*, *S. saprophyticus*가 2주, *S. carnosus*가 2주, 그리고 *S. xyloso* 1주가 분리되었으며 16S rRNA를 이용하여 genotyping을 실시한 결과 동일한 세균으로 판정되었다. 판정된 세균중 정상세균총으로 동물과 사람에게 감염을 야기하지 않은 *S. carnosus* 2주를 제외한 나머지 15균주에 대한 항생제 내성 분석은 Vitek을 이용하여 실시하였으며, methicillin 내성유전자인 *mecA* 유전자 확인은 17주 모두를 대상으로 하였다.

**닭에서 분리된 MRCNS의 항생제 감수성 patterns**

MRCNS 15주에 대한 항생제 감수성 pattern을 분석한 결과, 15 분리주 모두 penicillin, methicillin에는 내성을 보였으며 gentamicin, habekacin, linezolid, nitrofurantoin, trimethofrim-sulfonamide 및 vancomycin에

는 감수성을 나타내었다(Table 4). 그러나 현재 닭에 많이 사용되고 있는 ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, tetracycline 4개의 항생제에는 다양성을 나타내었다. 특히 *S. cohnii*의 경우 6주 모두 다른 항생제 내성 pattern을 나타내었다. 하지만 *S. lentus*는 3주 모두 동일한 항생제 내성 pattern을 나타내었으며 다양성을 나타내는 항생제 중 ciprofloxacin에만 감수성을 보이고 다른 항생제에는 내성을 나타내었다. *S. saprophyticus* 2주는 clindamycin와 tetracycline 서로 다른 내성 pattern를 나타내었다. *S. simulans* 3주는 ciprofloxacin와 tetracycline에 다른 항생제 내성 pattern를 나타내었으며 *S. simulans*는 1주에서만 nitrofurantoin에 intermediate를 나타내었으며 다른 14주는 모두 감수성을 보였다. 유일하게 1주만 분리된 *S. xyloso*는 ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, tetracycline 모두에 대하여 내성을 보였다.

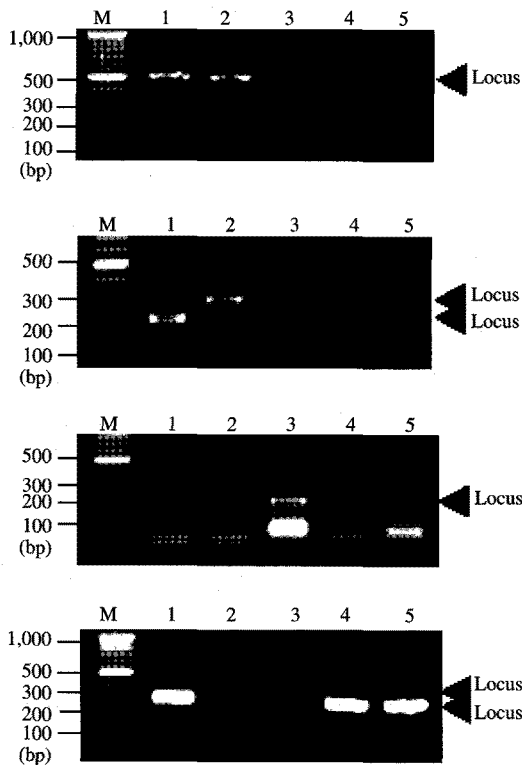


**Fig. 1.** *mecA* gene amplified from the isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS) by PCR with *mecA*-specific primers. [Lane M; DNA molecular marker (100bp plus DNA ladder, Bioneer), Lane 1: *S. aureus* (ATCC 25923), Lane 2: MRSA isolated from human, Lanes 3 to 4 MRCNS isolated from chickens, Lanes 5 to 6: MSCNS isolated from chickens].

**Table 4.** Patterns of antimicrobial susceptibility to MRNCS isolated from chickens

Antimicrobial agent	MRCNS strains													
	<i>S. c</i> (n=6)						<i>S. sa</i> (n=2)		<i>S. si</i> (n=3)			<i>S. l</i> (n=3)	<i>S. x</i> (n=1)	
Ciprofloxacin	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	
Clindamycin	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	
Erythromycin	S	R	I	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	
Gentamicin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Habekacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Linezolid	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Nitrofurantoin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	
Oxacillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
Penicillin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
Rifampin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Teicoplanin	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	
Tetracycline	S	S	I	S	R	I	S	R	I	R	R	I	R	
SXT	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
Vancomycin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	

*S. c*: *S. cohnii*, *S. sa*: *S. saprophyticus*, *S. si*: *S. simulans*, *S. l*: *S. lentus*, *S. x*: *S. xyloso*, ( ): numbers of isolates, SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole, R: resistant, I: intermediate, S: susceptible



**Fig. 2.** SCCmec types identified by PCR with SCCmec loci A-H primers. [Lane M; DNA molecular marker (100bp plus DNA ladder, Bioneer). Locus A and D; type I, Locus B and C; type II, locus C, E and F; type III, locus D; type IV, Locus G; Ia type, Locus H; IIIa, Lane 1: SCCmec type Ia and III, Lane 2: SCCmec type I and II, Lane 3: SCCmec type I and IV, Lane 4 to 5: SCCmec type IIIa].

### MRCNS의 *mecA* 유전자 검출

닭에서 분리된 MRCNS 17주에 대하여 methicillin 내성을 담당하는 *mecA* gene을 가지고 있는 지를 확인하기 위하여 *mecA* 특이 primer를 사용하여 PCR를 수행하였다. 그 결과 MRCNS 17주 모두에서 *mecA* 유전자가 검출되었고, MSCNS에서는 *mecA* 유전자가 검출되지 않았다(Fig. 1).

### MRCNS의 SCCmec type

*mecA* 유전자가 검출된 MRCNS 17주에서 *mecA* 유전자가 검출되어 SCCmec typing을 수행하기 위하여 Mec locus A-H에 해당되는 primer를 이용하여 locus A와 D는 각각 PCR를 수행하였으며, locus BC와 locus EGF는 mutiple-PCR을 수행하였다. 그 결과 SCCmec type I, Ia, II, III, IIIa, IV 등이 검출되었으며 type V는 검출되지 않았다. 어떤 균주에서는 SCCmec type을 결정할 수가 없었다(Fig 2). 일부 균주는 사람에서 분리

된 MRSA에서 나타나는 것처럼 1종의 SCCmec type만을 보유하고 있었으나 일부 균주에서는 혼합된 SCCmec type을 가지고 있었다. 특히 혼합형 SCCmec type에서는 대부분 type I으로 나타났으며, 다른 type들이 혼합된 형태를 나타내었다.

## 고찰

국내 축·수산 분야의 항생제 오남용과 내성균 문제가 커지면서 도계장 및 농가에서 생산되는 가축류의 항생제 내성균이 증가하고 있다. 내성균 증가의 주요 원인은 무분별한 항생제 오남용으로 인간, 가축, 야생동물, 양식 어류, 토양, 하천, 바다 등 환경 전체가 오염되었기 때문이다(Lindblad 등, 2006; Lindsay, 2008). 항생제 내성균은 원내감염뿐만 아니라 채소와 과일, 벼농사, 쇠고기, 우유, 돼지고기, 닭고기 브로일러산업, 달걀, 어패류 양식업 등에 오염되고 있으며, 가축의 분변이나 시체 등을 통해서도 토양·하천·바다 등 환경 속으로 내성균이 배출되고 있다. 항생제 내성균 중 가장 많은 원내감염 및 지역사회감염의 대부분이 staphylococci에 의한 것이다(Martins와 Cunha Mde, 2007; McNamee와 Smyth, 2000).

충남에 위치한 양계장 및 도계장에서 CPS인 *S. aureus*는 호흡기 가검물에서 검출되지 않았으나 CNS는 26.6%의 검출률을 보였으며 CNS중 MRCNS는 27.7%가 검출되어 methicillin에 대한 높은 내성을 나타내었다. 이는 일본에서 건강한 닭의 콧구멍과 피부에서 분리된 staphylococci 중에서도 MRCNS의 25.7%의 분리율과 매우 비슷했으나 분리균종으로는 *S. sciuri*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* 순으로 나타났으나(Awan과 Matsumoto, 1998; Forder 등, 2008; Kawano 등, 1996; Vuong와 Otto, 2002), 이 연구에서는 *S. cohnii*가 6주로 가장 많이 분리되었다. 즉 *S. simulans*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. carnosus*, *S. xylosus* 순으로 분리되어 *S. saprophyticus* 외에는 다른 균주들이 분리되어, 닭의 코와 피부에서 일반적으로 분리되는 CNS인 *S. hyicus*, *S. gallinarum*, *S. arlettae*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*중에 *S. xylosus*만을 제외하고는 분리균이 일치하지 않았다(Kawano 등, 1996; Kloos와 Bannerman, 1999; McNamee와 Smyth, 2000). 이 연구에서 분리된 세균들은 닭에 정상적으로 존재하는 세균보다는 사람에게 감염될 수 있는

세균들이 분리되어 닭에서 유래한 것인지 아니면 사람에게서 유래한 MRCNS인지 알 수는 없지만 닭에서 분리된 세균이 다시 사람에게 감염을 야기할 수 있으며 감염후 항생제 내성을 보유하고 있어 치료가 어려울 수 있다는 정보를 제공하였다.

현재 포도구균에 의한 식중독 등이 문제가 되고 있으며, chicken salad에서 enterotoxigenic *S. aureus* 외에도 *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. xylosus* 등이 식중독을 일으키는 enterotoxin을 생산하는 것으로 알려져 있다(Pepe 등, 2006; Skalka, 1985). 이 연구에서도 *S. cohnii*나 *S. xylosus*가 분리가 되어 식중독을 일으킬 수 있어 앞으로 enterotoxin type을 연구하여 비병원성균으로 분류되어 *S. xylosus*에 대한 병원성 연구가 필요하다(Dakić 등, 2005; Forder 등, 2008; Kloos와 Bannerman, 1999). 한편 *S. cohnii*는 hemolysin을 가지고 있으며 닭의 간에도 감염되며 사람에게서 식중독 외에 중추신경계에 농양형성 및 피부의 세포괴사에도 관여하는 것으로 알려져 있다.

젖소나 반추우의 유방염에 관계하는 *S. simulans*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. carnosus*, *S. xylosus*가 닭에서 분리되어 양계농장 주변의 다른 낙농농가 등에 감염을 유발할 수 있는 요인이 되며, 사람과 동물에 피부 감염도 야기할 수 있다. 닭에서 자주 분리되는 *S. aureus*와 *S. hycus*가 이 연구에서는 검출되지 않았으며 닭에서 검출되지 않는 *S. intermedius*도 분리되지 않았다(Cha 등, 2009; Kloos와 Bannerman, 1999; McNamee와 Smyth, 2000). *S. lentus*도 enterotoxin을 분비하며 사람에게서 식중독을 야기할 수 있으며 원내감염을 야기한다. *S. saprophyticus*는 사람의 피부에 상재하는 혐기성 세균으로 심내막염이나 균혈증을 유발한다. *S. carnosus*와 *S. xylosus*는 사람에게선 비병원성 세균으로 분류되며 소세지나 물고기 발효에 이용되는 세균이다(Kloos와 Bannerman, 1999).

MRCNS 분리주 모두에서 *mecA* 유전자가 검출되어 methicillin 내성이 *mecA* 유전자와 상관성이 있음이 확인되었다. SCC*mec*은 I-V type까지 알려져 있으며 I-III type은 주로 원내감염 그리고 IV type은 지역사회감염과 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Cha 등, 2009; Kloos와 Bannerman, 1999). 닭에서 분리된 MRCNS의 SCC*mec* type은 I형에서 IV형까지 항생제 내성과 비례하여 모두 검출되어 MRCNS에서도 SCC*mec* type 분석이 가능하였다.

충남의 양계장에서 MRCNS 분리율은 75%로 도계

장의 분리율에 비해 매우 높게 나타났지만 분리된 CNS가 많지 않아 양계장에 대한 더 많은 CNS의 분리가 필요하다.

그러나 닭에서 분리된 MRCNS는 사람에서 검출된 MRSA의 SCC*mec* type이 완전히 일치하지는 않거나 판별이 불가능한 type들이 있어 닭에서 분리된 MRCNS에서 다양한 유전자 변이를 통하여 더욱 다양한 형태의 SCC*mec* type이 존재함이 확인되어 앞으로 지속적인 연구가 필요하다. 특히 사람에서 분리된 MRSA의 SCC*mec* type을 한 개 또는 두 개의 multiple type을 가진 균도 검출되어 MRSA와는 다른 SCC*mec* type을 나타내고 있음이 관찰되어 MRCNS에서 더 많은 유전자 전이와 recombination이 일어나고 있음이 확인되었다. 특히 type III와 IIIa가 비교적 많이 출현하여 닭에 상재하고 있는 MRCNS들이 강한 항생제 내성을 가지고 있으며 피부형인 type IV도 type III 다음으로 많이 검출되어 지역사회감염에도 영향을 일으킬 수 있을 것이다. SCC*mec* IV type은 항생제에 대한 내성 정도가 낮고 hetero형이며, tetracycline이나 erythromycin 내성 유전자가 없으나 병독성이 크며 증식속도가 빠르다(Cha 등, 2009; Kloos와 Bannerman, 1999; McNamee와 Smyth, 2000). SCC*mec* type I은 사람에서는 주로 검출되지 않는 type이나 동물에서 분포하는 것으로 보이며 특히 multi-type을 나타내는 균종에서 type I을 공통적으로 가지고 있어 type I이 보다 잘 유전자 전이가 될 것으로 예상되었다.

*S. saprophyticus*는 CNS로 알려진 균으로 Gram 양성균이 내성을 갖는 항생제에는 내성이 잘 일어나지 않는 편이다. 그러나 최근 *mecA*-positive를 나타내는 SCC*mec* 요소를 갖는 *S. saprophyticus*가 출현하면서 내성 유전자에 관한 연구가 이루어지게 되었다(Kloos와 Bannerman, 1999; McNamee와 Smyth, 2000).

MRSA의 methicillin에 내성을 나타내는 *mecA* 유전자를 닭에서 분리된 CNS도 가지고 있으나 SCC*mec* type은 다소 다르게 검출되어 닭에 상재하는 CNS균들에서 다른 형태의 SCC*mec* type이 존재함이 확인되었지만 최근 양계 산업에 위협과 피해를 주고 있는 내성을 나타내는 항생제와 이번 실험 결과 내성을 보이는 많은 항생제의 종류가 어느 정도 일치하다는 것이다. Penicillin계 항생제를 넘어 다른 계열 항생제 역시 내성을 지니게 되어 극히 일부의 항생제만으로 치료가 가능한 MRCNS균이 증가하고 있다는 것이다. 따라서 앞으로의 양계 사육 농가에서는 MRSA 뿐만 아니라

MRCNS에 대한 보다 깊은 주의가 필요시 되고있다.

## 결 론

충남에 위치한 양계장 및 도계장의 닭의 호흡기 부위로부터 가검물을 채취하여 *Staphylococcus*속 균을 분리하고, 항생제 감수성시험을 통하여 MRCNS를 분리하고, SCCmec type 실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

61마리의 닭에서 노란색 집락을 선발되어 26.6%의 *Staphylococcus*속 균이 분리되었다.

MRCNS 15주에 대한 항생제 감수성 pattern을 분석한 결과, 15 분리주 모두 penicillin, methicillin에는 내성을 보였으며 gentamicin, habekacin, linezolid, nitrofurantoin, trimethoprim-sulfonamide 및 vancomycin에는 감수성을 나타내었다

닭에서 분리된 MRCNS 17주에 대하여 methicillin 내성을 담당하는 *mecA* gene을 가지고 있는 지를 확인하기 위하여 *mecA* 특이 primer를 사용하여 PCR를 수행한 결과 MRCNS 17주 모두에서 *mecA* 유전자가 검출되었다.

## 참 고 문 헌

- Aarestrup FM, Agersø Y, Ahrens P, Jørgensen JC, Madsen M, Jensen LB. 2000. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Vet Microbiol* 74(4): 353-364.
- Awan MA, Matsumoto M. 1998. Heterogeneity of staphylococci and other bacteria isolated from six-week-old broiler chickens. *Poult Sci* 77(7): 944-949.
- Cha EK, Chang KS, Hwang SM. 2009. Correlation between staphylococcal cassette chromosome *mec* type and coagulase serotype of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol Virol* 39(2): 71-78.
- Dakić I, Vuković D, Stepanović S, Hauschild T, Jezek P, Petráš P, Morrison DJ. 2005. Survey of genes encoding staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1, and exfoliative toxins in members of the *Staphylococcus sciuri* group. *Clin Microbiol* 43(9): 4875-4876.
- Forder RE, Firth GA, Tivey DR, Howarth GS, Hughes RJ. 2008. A small-scale, low-cost isolation system for the incubation and rearing of low bacterial load chicks as a model to study microbial-intestinal interactions. *Lab Anim* 42(2): 185-192.
- Kaszanyitzky EJ, Egyed Z, Jánosi S, Keseru J, Gál Z, Szabó I, Veres Z, Somogyi P. 2004. Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics. *Acta Vet Hung* 52(1): 7-17.
- Kawano J, Shimizu A, Saitoh Y, Yagi M, Saito T, Okamoto R. 1996. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. *J Clin Microbiol* 34(9): 2072-2077.
- Kloos WE, Bannerman TL. 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington DC: 264-282.
- Lindblad M, Lindmark H, Lambertz ST, Lindqvist R. 2006. Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses. *J Food Prot* 69(12): 2875-2882.
- Martins A, Cunha Mde L. 2007. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: Epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol* 51(9): 787-795.
- McNamee PT, Smyth JA. 2000. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis ('femoral head necrosis') of broiler chickens. *Avian Pathol* 29(5): 477-495.
- Pepe O, Blaiotta G, Bucci F, Anastasio M, Aponte M, Villani F. 2006. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin A in breaded chicken products: detection and behavior during the cooking process. *Appl Environ Microbiol* 72(11): 7057-7062.
- Skalka B. 1985. Modern scheme for the diagnosis of staphylococci. *Vet Med (Praha)* 30(8): 477-484.
- Vuong C, Otto M. 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect* 4: 481-489.